

Análisis molecular de las bacterias asociadas a los depósitos de desechos de *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae)

Molecular analysis of bacteria associated with refuse dumps of *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae)

ADRIANA ORTIZ-REYES^{1,2}, TATIANA M. GIRALDO-JARAMILLO^{1,3} y CLAUDIA XIMENA MORENO-HERRERA^{1,4}

Resumen: La composición bacteriana asociada a depósitos de desechos de las hormigas *Atta cephalotes* en cautiverio, se analizó empleando métodos de microbiología molecular. Ocho cepas bacterianas se aislaron utilizando métodos dependientes de cultivo, pertenecientes a los fila Firmicutes, Proteobacterias y Actinobacterias. De acuerdo con el análisis molecular de los perfiles de electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (PCR-DGGE) de las tres áreas de desecho de *A. cephalotes*, se encontraron diferencias en las comunidades bacterianas presentes en la fracción total (FT, ADN extraído directamente del área de desecho) y en la fracción cultivable (FC, ADN obtenido después del cultivo). En la fracción total se encontró similitudes superiores al 60 % entre los perfiles de los tiempos (0 y 15 días) para dos de las áreas de desecho (1H y 3H). El análisis de las secuencias del ADN obtenido de las bandas del DGGE reveló el predominio de los fila Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes, incluyendo cinco géneros (*Ralstonia*, *Burkholderia*, *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. y *Myroides* sp.) y un grupo de bacterias no cultivadas hasta el momento, siendo *Bacillus* el grupo dominante en todas las muestras analizadas. Los géneros encontrados se destacan por su potencial en la degradación de materia orgánica, como promotores de crecimiento de plantas y por su actividad antimicrobiana. En este estudio mostramos el primer análisis molecular de la comunidad bacteriana asociada a las áreas de desecho de las hormigas *A. cephalotes* en nidos artificiales. Nuestro trabajo revela la presencia de microbios asociados consistentemente en los depósitos y sugiere que las comunidades residentes están determinadas por la degradación de residuos de la planta y de las hormigas. Se requiere mayor investigación para evidenciar su función y su posible aplicación.

Palabras clave: Hormigas cortadoras de hojas. Diversidad bacteriana. PCR-DGGE. ADNr 16S. Microbiota.

Abstract: The composition of bacteria associated with refuse dumps of *Atta cephalotes* ants living in captivity was investigated using molecular microbiology methods. Eight different bacterial strains were isolated using culture-dependent methods; these belonged to the Firmicutes, Proteobacteria and Actinobacteria phyla. According to molecular analysis using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE), there were differences in the bacterial communities present in the total fraction (TF, DNA extracted directly from the waste disposal area) and the cultivable fraction (CF, DNA obtained after culturing) of the three *A. cephalotes* waste disposal areas. However, similarities greater than 60 % were observed between the profiles for the total fraction at the sampling times (0 and 15 days) in two of the waste disposal areas (1H and 3H). The analysis of the DNA sequences obtained from the DGGE bands revealed the predominance of the Proteobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes phyla, including five genera (*Ralstonia*, *Burkholderia*, *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Myroides* sp.) and one group of uncultured bacteria. *Bacillus* was the most dominant bacterial group in all of the samples analyzed. Some of the genera found have been studied for their potential role in degrading organic matter, promoting plant growth, and acting as antimicrobial agents. This paper provides the first molecular analysis of the bacterial communities associated with refuse dumps of *A. cephalotes* lab colonies. Our research revealed the presence of consistently associated microbes in refuse dumps; this suggests that resident communities are shaped by the degradation of plant residues and ants. Further research is needed in order to demonstrate function and possible applications.

Key words: Leafcutter ants. Bacterial diversity. PCR-DGGE, 16S rDNA. Microbiota.

Introducción

Las hormigas cortadoras de hojas son dominantes herbívoros en los ecosistemas que habitan, utilizan una amplia variedad de plantas para el sostenimiento de cultivos del hongo *Leucoagaricus gongylophorus*, fuente de alimento de las hormigas (Mueller *et al.* 2001). Esta estrategia evolutiva les ha permitido optimizar el recurso vegetal a tal punto que pueden llegar a forrajear hasta el 17 % de la biomasa foliar en algunos ecosistemas (Costa *et al.* 2009). Las hormigas cortadoras *Atta cephalotes* (L.) viven en nidos subterráneos donde albergan a millones de obreras, la arquitectura de los nidos ha sido estudiada por Moreira *et al.* (2004), los autores han encontrado que los nidos pueden llegar a contener miles de cámaras donde se cultiva el hongo, se encuentra la reina, las

cría y las destinadas como depósitos de basura, llegando a remover hasta 40.000 Kg de suelo (Hölldobler y Wilson 2010).

El éxito de las hormigas cortadoras de hojas ha sido atribuido en parte a la eficiencia que presenta los cultivos de *L. gongylophorus* como un sistema integrado de manejo. Currie y Stuart (2001) señalan como el comportamiento que despliegan las hormigas jardineras, juega un papel fundamental en la remoción mecánica de contaminantes de los cultivos. Igualmente se ha estudiado el papel que juega el hongo en los procesos bioquímicos durante el proceso de degradación de la biomasa del material vegetal, encontrando que *L. gongylophorus* cuenta con enzimas de la familia de las hemicelulasas, pectinasas, almidasa y lacasas (Silva *et al.*, 2006 a y b; Aylward *et al.*, 2013a; Lange y Grell 2014). Adicionalmente, Aylward *et al.* (2015) dan evidencia del

¹ Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias, Calle 59 A No. 63 - 20 Autopista Norte, Medellín, Código Postal 050034, Medellín, Colombia. Tel.: 4309822. ² Ph. D. Laboratorio de Insectos y Biotecnología, Facultad de Ciencias. Grupo Sustancias Activas y Biotecnología. ³ M. Sc. Laboratorio Biología Molecular y Celular, Grupo de Microbiodiversidad y Bioprospección. ⁴ Ph. D Laboratorio Biología Molecular y Celular, Grupo de Microbiodiversidad y Bioprospección. cxmoreno@unal.edu.co, autor para correspondencia.

papel que estaría cumpliendo las gongylidias, estructuras que son características de las hifas del hongo, donde se concentran las enzimas producidas y al ser ingeridas por las hormigas no sufren ninguna alteración cuando pasan por el tracto digestivo, pero al ser expulsadas en forma de gotas fecales en las diferentes áreas de los jardines facilitan la degradación de la biomasa.

No obstante, no todos los procesos bioquímicos dependen del hongo, diferentes trabajos han puesto en evidencia que existe un consorcio de microorganismos representado principalmente por los géneros *Klebsiella*, *Pantoea*, *Escherichia* y *Citrobacter*, asociados con los procesos de degradación de la pared celular y la biosíntesis de aminoácidos, vitamina B y otros nutrientes que posiblemente potencializan el crecimiento de la biomasa en los cultivos (Scott *et al.* 2010; Suen *et al.* 2010; Aylward *et al.* 2012a; Huang *et al.* 2014). Los estudios se han enfocado en general a bacterias cultivables, generando hipótesis que abordan relaciones coevolutivas entre los microorganismos asociados a las hormigas y sus microhabitats. Se han reportado bacterias filamentosas (actinomicetos) productoras de antibióticos que suprimen el crecimiento de patógenos como *Escovopsis*, hallazgos que indican que los microorganismos pueden ser componentes claves en la regulación de otras asociaciones simbióticas con organismos superiores (Haeder *et al.* 2009; Currie 2001). No obstante, trabajos por Riesenfeld *et al.* (2004) y Scott *et al.* (2010) ponen en evidencia cómo la riqueza y diversidad de microorganismos, supera en un alto porcentaje a lo evaluado mediante técnicas convencionales.

A pesar de los avances que se han dado en el estudio de los jardines del hongo, las áreas de desecho no han recibido la misma atención sin embargo, es importante entender que estas cámaras donde se acumula, material del jardín que es descartado y de hormigas muertas, podrían ser una fuente de contaminantes o de patógenos para el hormiguero. Las especies que construyen las cámaras de desecho dentro de los nidos como es el caso *A. cephalotes* se protegen de una posible fuente de infección para la colonia con el manejo adecuado de residuos. Algunos de los trabajos que se han desarrollado, muestran propiedades antibacterianas de microorganismos presentes en el material de desecho (Lacerda *et al.* 2010) además, para la casta que trasporta los desechos en *A. cephalotes* se han asociado especies de la familia *Enterobacteriaceae*, especialmente a *P. aeruginosa* (Giraldo 2009). En el área de desechos de nidos artificiales de *A. cephalotes* el trabajo de Vélez (2008) reporta los aislados de especies *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, y *Klebsiella* sp. como dominantes. Scott *et al.* (2010) reportan diferencias entre las comunidades bacterianas de jardines comparados con áreas de desecho, las primeras se caracterizan por bacterias Gram negativas principalmente Proteobacterias y Bacteroidetes, mientras que en las segundas las bacterias dominantes son Grampositivas y bacterias anaerobias.

El objetivo de este estudio fue analizar la comunidad bacteriana asociada a tres áreas de desecho de las hormigas cortadoras de hojas *A. cephalotes* en nidos artificiales, usando métodos dependientes e independientes de cultivo incluyendo la amplificación del gen ADNr 16S, los perfiles de electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE), que permite la detección de las comunidades bacterianas predominantes y el análisis filogenético de las secuencias encontradas. El presente artículo es el primer análisis molecular de la comunidad microbiana asociada a los depósitos de las hormigas,

un mejor conocimiento de las poblaciones bacterianas podría ayudar para la formulación y uso de los desechos como abonos naturales, siendo necesaria mayor investigación para evidenciar su función y su posible aplicación.

Materiales y métodos

Diseño experimental. Las muestras del área de desecho se procesaron usando técnicas de cultivo-independiente y dependiente. Las técnicas de cultivo-independiente (análisis molecular) están basadas en el gen 16S rRNA y se utilizan para el análisis de la estructura microbiana, proporcionando información de los grupos microbianos dominantes, las técnicas cultivo dependiente (análisis microbiológico) se utilizaron como estrategia para el aislamiento y la identificación de las bacterias presentes.

Colección de muestras. Se colectaron ocho muestras del área de desecho de tres hormigueros en nidos artificiales, provenientes del Municipio de Barbosa, Antioquia. Las colonias se establecieron y mantuvieron en el terrario del Laboratorio de Insectos y Biotecnología en la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Los muestreos se realizaron en condiciones del laboratorio entre 23 °C y 50 % de humedad y cuando había una acumulación en el área de desecho de ocho días siendo esta la muestra cero (día 0) y la segunda muestra a los 15 días posteriores a la primera toma (día 15). Seis muestras individuales se colectaron de los tres hormigueros (1H0-1H15, 2H0-2H15 y 3H0-3H15) y dos muestras adicionales de la mezcla para cada día de muestreo (M0 y M15) como se describen en la figura 1. Las mezclas (M0 y M15) se realizaron para permitir un procesamiento homogéneo de la fracción cultivable en cada tiempo y medio analizado. Las muestras se guardaron en bolsas con cierre hermético a 4 °C y se procesaron en el laboratorio.

Análisis molecular

Extracción de ADN. Fue extraído del área de desecho (0,25 g) utilizando el kit comercial Power Soil (Laboratorios MO-BIO California, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se maceraron previamente con nitrógeno líquido y el ADN total extraído directamente del área de desecho de cada hormiguero fue nombrado como fracción total (FT).

Amplificación por PCR-DGGE. La región variable V3-V5 del gen rRNA 16S, fue amplificada para obtener los perfiles de las comunidades bacterianas presentes en las diferentes áreas de desechos de los hormigueros. El ADN genómico obtenido de la fracción total (FT) fue amplificado por PCR para obtener un fragmento de 566 pb usando los cebadores universales 341F (5' -CCT ACG GGA GGC AGC AG-3' con una terminación extra de G-C en el extremo 5') y 907R (5' - CCC CGT CAA TTC ATT TGA GTT Y- 3') como lo describen Muyzer *et al.* (1993) y Romero y Navarrete (2006). La reacción de PCR fue hecha como lo detalla Romero y Navarrete, (2006) con una mezcla de reacción 30 ul que contenía 0,2 mM de cada deoxinucleótido trifosfato, 0,05 U/ml de ADN polimerasa Taq (Fermentas, USA), buffer de reacción 1X, MgCl₂ 2 mM, y de cada cebador 0,25 pmol/ml. Los amplicones obtenidos se evaluaron en geles de poli(acrilamida) al 6 % con gradiente químico 30-60 % urea y formamida. Las

condiciones de corrido (60 °C y 85 V) se mantuvieron constantes durante 15 h (Romero y Navarrete 2006). Luego de la electroforesis el gel fue teñido con nitrato de plata (AgNO_3) (Espejo y Escanilla 1993) las bandas dominantes se escindieron para reamplificar el ADN y enviarlo a secuenciar.

Análisis de perfiles electroforéticos. Los patrones de bandeado se analizaron por medio del software Gel Compare II (Applied Maths Biosystem, Bélgica) (Rademaker y De Bruijn, 2004) usando las correlaciones de Pearson y Complete Linkage (Koeppel *et al.* 2008) para establecer las diferencias en la diversidad y abundancia de los perfiles de las poblaciones bacterianas entre las muestras analizadas.

Secuenciación. Las bandas de interés de los geles del PCR-DGGE se cortaron y eluyeron mediante el protocolo descrito por Sambrook (2001). Posteriormente la solución del ADN (5 µl) se reamplificó con los cebadores 341F y 907R, sin el extremo de GC. Los amplicones seleccionados se secuenciaron en ambas direcciones usando el analizador de ADN PRISM 3700 (Applied Biosystems) y los resultados obtenidos se editaron con en el software Bioedit (Hall 1999) y se compararon con secuencias de referencias identificadas previamente usando la herramienta del BLAST (Altschul *et al.* 1997) y de las bases de datos del GenBank y Ribosoma Database Project II (RDP II) (Cole *et al.* 2005)

Análisis filogenéticos. Las secuencias editadas se utilizaron para construir las matrices de distancia y se corrigieron por el análisis de sustitución nucleotídica Jukes Cantor incluidos en el programa del Software MEGA 5 version 5.05 (Tamura *et al.* 2011). Usando, el mismo programa fue construido un árbol filogenético, con el método de “neighbor-joining”. El “bootstrapping” fue realizado con 1.000 réplicas y son reportados los valores superiores al 40 %. Las secuencias se depositaron en el GenBank (números de acceso: KC800898-KC800913).

Análisis microbiológico

Medios de cultivo. Los análisis microbiológicos de las seis muestras de los días 0 y 15 se procesaron inmediatamente mientras, las mezclas (M0 y M15) del área de desecho de los hormigueros se conservaron a -20 °C hasta su procesamiento luego de los 15 días. Las muestras se inocularon al 0,01 % (w/v) en el medio LB (Luria Bertani), realizando diluciones seriadas hasta una concentración de 10^{10} veces. Las siembras se hicieron en dos medios de cultivo diferentes, medio SEGYEA (MS) preparado como lo indica (Atlas y Philip 2005) y el medio Luria Bertani (M3), suplementado al 1 % con el extracto del área de desecho de los hormigueros de *A. cephalotes*.

Aislamiento y caracterización. Las muestras inoculadas por duplicado en los medios anteriormente descritos se incubaron a 33 ± 1 °C durante 4 días. Luego de la incubación se registró el número de unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g). El total de las UFC crecidas en el medio de cultivo se homogenizó en solución salina y fue usado como la fracción cultivable (FC), correspondiente al total de colonias crecidas en los medios empleados (M3 y MS), este homogenado fue empleado para aislamiento de ADN y análisis molecular. Además, se seleccionaron las colonias más predominantes

para ser purificadas por agotamiento en el medio M3. Los aislados seleccionados se caracterizaron macroscópicamente por morfología de la colonia y microscópicamente por coloración de Gram. Las colonias purificadas se conservaron por duplicado en glicerol al 20 % y se almacenaron a -80 °C hasta su identificación molecular.

Extracción de ADN de colonia. El ADN de los aislados y el ADN obtenido de los homogenizados de las colonias crecidas sobre los medios M3 y MS, correspondiente a la fracción cultivable (FC), se logró obtener empleando el kit UltraClean® Microbial ADN Isolation (laboratorios MOBIO) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las alícuotas finales de ADN se cuantificaron usando el NanoDrop 2000/2000c (Thermo Scientific).

Amplificación por PCR. Para la amplificación del gen ARNr 16S de los aislados, se emplearon los cebadores universales 27F (5' -AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3') y 1492R (5' -GGT TAC CTT GTT ACG ACT T- 3') (García *et al.* 2016). Además, para evaluar las poblaciones bacterianas predominantes de la fracción cultivable (FC) se usó la reacción de PCR-DGGE, en las condiciones de amplificación, corrida, tinción y análisis de perfiles previamente descritas para el análisis molecular de la fracción total (FT).

Secuenciación. Las bandas de interés de los perfiles de las muestras MS y M3 generados por los barridos bacterianos o fracción cultivable (FC), se escindieron y eluyeron del gel mediante el protocolo descrito por Sambrook (2001). Posteriormente los fragmentos se reamplificaron con los cebadores 341F y 907R con el fin de verificar los productos de PCR obtenidos. Los amplicones se secuenciaron usando el analizador de ADN ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems) y las secuencias obtenidas se editaron y analizaron como se describe para la fracción total (FT).

Resultados

Los resultados describen el análisis de los perfiles de DGGE de los fragmentos amplificados del ADNr 16S bacteriano y de los aislados obtenidos de las muestras de la fracción del ADN total (FT) de las áreas de desecho de los hormigueros analizados (1H, 2H, 3H, M0 y M15) para los tiempos 0 y 15 días y de la fracción cultivable (FC) (M3 y MS).

Composición de la comunidad bacteriana por PCR-DGGE de la fracción del ADN total (FT). Los perfiles de las bandas del DGGE mostraron la presencia de varios posibles filotipos bacterianos de las diferentes áreas de desecho de los hormigueros examinados (Fig. 1). Los patrones de bandeado analizados por medio del software Gel Compare II revelaron la formación de dos “clústeres” (agrupamientos) para las muestras de la FT (Fig. 2A); en el I se agrupan con un porcentaje de similitud superior del 50 % los perfiles de las muestras del hormiguero tres (3H0-3H15), las mezclas M0 y M15 en el II se agrupan las muestras de los otros dos hormigueros (1H0, 1H15 y 2H0) la muestra del 2H15 presenta diferencias superiores al 70 % con respecto a los dos grupos anteriores; sugiriendo la presencia de diferentes poblaciones bacterianas en cada grupo.

Las bandas más intensas detectadas en los geles del DGGE, las cuales indicaban las poblaciones más abundan-

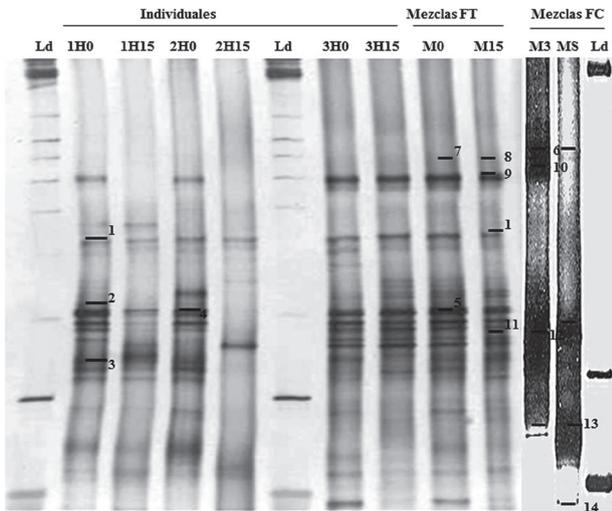


Figura 1. Perfiles del DGGE de los productos de amplificación del ADNr 16S del área de desecho de las hormigas cortadoras de hojas *A. cephalotes*. Carril Ld: Marcador 100 pb. Carril 1H0-1H15, 2H0-2H15, 3H0-3H15: muestras del área de desecho hormiguero uno, dos o tres del día cero (0) ó 15, respectivamente. Carril M0: Amplificado del ADN de la fracción total (FT) mezcla de los tres hormigueros del día 0. Carril M15: FT mezcla de los tres hormigueros del día 15. Carril MS: fracción cultivable (FC), barrido del medio SEG YEA (MS), Carril M3: FC, barrido del medio Luria Bertani (M3).

Composición de la comunidad de bacterias por análisis dependiente de cultivo. Bajo las condiciones empleadas y transcurrido cada tiempo de maduración de cultivo, se procesaron las muestras con el fin de obtener recuento de poblaciones de microorganismos presentes en los desechos, obteniendo un promedio de 9×10^6 UFC/g (unidades formadoras de colonia por gramo, en el medio M3). Los perfiles de las bandas del DGGE de las muestras procedentes de la fracción cultivable (FC), mostraron la presencia de varios filotipos (Fig. 1). Los patrones de bandeo se compararon con algunos aislados predominantes en los cultivos (C1-C8) y con las muestras procedentes de las mezclas de la fracción total (FT) y la fracción cultivable (FC) luego del análisis con el software Gel Compare II (Fig. 2B). Las bandas (6,10, 12, 13, y 14) obtenidas de los geles del PCR- DGGE de las muestras de la FC de las áreas de desecho de los hormigueros (MS y M3) (Fig. 1), se seleccionaron para ser identificadas por secuenciación, los resultados de la identidad de las bandas y de los aislados seleccionados y caracterizados se muestran en la Tabla 1.

Las bacterias aerobias predominantes pertenecen a *Bacillus* (bandas 10-12), aunque también se identificaron otros dos géneros bacterianos *Myroides* KC800897 (banda 6) y *Enterobacter* KC800907- KC800908 (bandas 13-14). Además, los aislados a partir del cultivo identificados por secuenciación del ADNr 16S se agruparon con las especies de *Alcaligenes faecalis* con un porcentaje de identidad del 99 % (CP2HTA-KC800910), *Staphylococcus* sp. (95 %)

tes en cada muestra se escindieron y la secuencia parcial del ADNr 16S de aproximadamente 500 bases se obtuvo directamente del reamplificado de las bandas. Estas secuencias se compararon con las secuencias disponibles en los bancos de secuencias (Tabla 1) y las afiliaciones filogenéticas se muestran en la figura 3. Nuestros resultados identificaron a *Ralstonia* sp. KC800898 - KC800899 (bandas 1-2), *Burkholderia* sp. KC800900 - KC800902 (bandas 3-5) y a *Bacillus* sp. KC800906 y KC800904 (bandas 9 y 11). Además, las muestras de las mezclas de los hormigueros (M0 y M15) mostraron la presencia de bandas débiles (banda 7-8) con una secuencia relacionada con bacterias que no se han cultivado hasta el momento KC800914- KC800915, respectivamente.

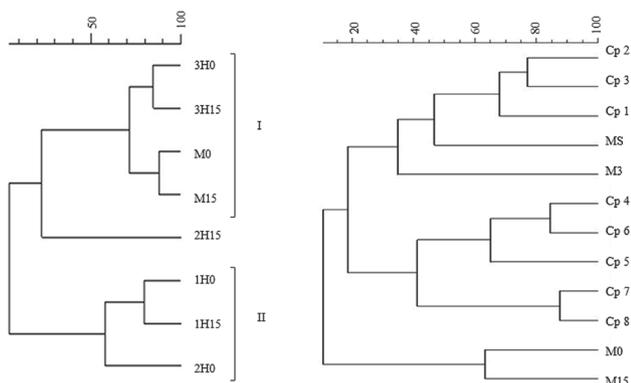


Figura 2. Dendrograma de los perfiles del DGGE de los productos amplificados del gen RNAr 16S a partir de muestras tomadas del área de desecho de las hormigas cortadoras de hojas *A. cephalotes*. Panel A, muestras de la fracción total (FT), Panel B, muestras de la fracción cultivable (FC), colonias aisladas (Cp1-Cp8) y fracción total (FT).

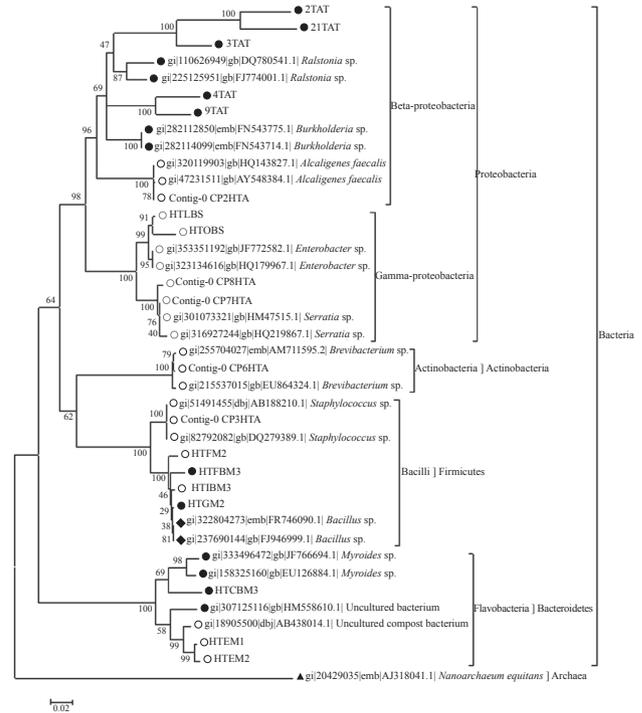


Figura 3. Árbol filogenético basado en las secuencias parciales del ADNr 16S, de las muestras de los desechos de las hormigas cortadoras de hojas *A. cephalotes*. El árbol muestra la relación existente entre las secuencias recuperadas de los perfiles del DGGE y los aislados con la secuencia más cercana depositada en los bancos de secuencias del RDP II y el Genbank. El árbol fue construido con el método estadístico “neighbour-joining”, con un bootstrap de 1000 repeticiones y usando como “outgroup” a *Nanoarchaeum equitans* (Archaea).

Tabla 1. Análisis de las secuencias del ADNr 16S obtenidas de las bandas del DGGE y de los aislados bacterianos de las muestras de las áreas de desechos de los hormigueros, con la secuencia conocida de la base de datos del RDP II y Genbank.

Nombre: * origen	Número de acceso	Porcentaje de identidad	Phylum/clase	Secuencia relacionada	
Bandas del DGGE de individuales					
1	2 TAT: 1H0	KC800898	78	Proteobacteria / β - Proteobacteria	<i>Ralstonia</i> sp.
2	3 TAT: 1H0	KC800899	83	Proteobacteria / β - Proteobacteria	<i>Ralstonia</i> sp.
3	9 TAT: 1H0	KC800902	87	Proteobacteria / β - Proteobacteria	<i>Burkholderia</i> sp.
4	4 TAT: 2H0	KC800901	86	Proteobacteria / β - Proteobacteria	<i>Burkholderia</i> sp.
Bandas del DGGE de mezclas					
5	21TAT: FTM0	KC800900	88	Proteobacteria / β - Proteobacteria	<i>Burkholderia</i> sp.
6	3HTCBM3: FCM3	KC800897	92	Bacteroidetes/ Flavobacteria	<i>Myroides</i> sp.
7	HTEM1: FTM0	KC800914	91	Bacteroidetes/ Flavobacteria	Bacteria no cultivada
8	HTEM2: FTM15	KC800915	91	Bacteroidetes/ Flavobacteria	Bacteria no cultivada
9	HTFM2: FTM15	KC800906	96	Firmicutes /Bacilli	<i>Bacillus</i> sp.
10	HTFBM3: FCM3	KC800905	96	Firmicutes /Bacilli	<i>Bacillus</i> sp.
11	HTGM2: FTM15	KC800904	98	Firmicutes /Bacilli	<i>Bacillus</i> sp.
12	HTIBM3: FCM3	KC800903	98	Firmicutes /Bacilli	<i>Bacillus</i> sp.
13	HTLBS: FCMS	KC800907	99	Proteobacteria / γ - Proteobacteria	<i>Enterobacter</i> sp.
14	HTOBS: FCMS	KC800908	99	Proteobacteria / γ - Proteobacteria	<i>Enterobacter</i> sp.
Aislados					
	CP1HTA	NI			NI
	CP2HTA	KC800910	99	Proteobacteria / β - Proteobacteria	<i>Alcaligenes faecalis</i>
	CP3HTA	KC800909	95	Firmicutes /Bacilli	<i>Staphylococcus</i> sp.
	CP4HTA			Actinobacteria/ Actinobacteria	<i>Brevibacterium</i> sp.
	CP5HTA	NI			NI
	CP6HTA	KC800911	97	Actinobacteria/ Actinobacteria	<i>Brevibacterium</i> sp.
	CP7HTA	KC800912	98	Proteobacteria / γ - Proteobacteria	<i>Serratia</i> sp.
	CP8HTA	KC800913	96	Proteobacteria / γ - Proteobacteria	<i>Serratia</i> sp.

*Nomenclatura del origen: (1H0 - 2H0) muestras del área de desecho hormiguero uno y dos al tiempo cero; (FTM0 - FTM15) fracción total día cero o día 15; (FCMS - FCM3) fracción cultivable del medio SEGYEA (MS) o del medio Luria Bertani (M3). Ni: no identificado.

(CP3HTA-KC800909), *Brevibacterium* sp. (97 %) (CP6HTA-KC800911) y *Serratia* sp. (98 %) (CP8HTA-KC800913 y CP7HTA-KC800912). Las afiliaciones filogenéticas de las secuencias analizadas se muestran en la figura 3.

Discusión

El presente estudio es uno de los primeros en evaluar la composición microbiana asociada a la cámara de desechos de colonias de hormigas *A. cephalotes* en condiciones de laboratorio, utilizando el análisis del DGGE y de las secuencias del ADNr 16S para identificar filotipos bacterianos. Las secuencias de los fragmentos del gen ribosomal 16S se compararon con la base de datos del GenBank y el análisis mostró homología con las secuencias de especies que pertenecen a los fila Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria dentro de los cuales se encuentran *Burkholderia* sp., *Ralstonia* sp., *Serratia* sp., *Enterobacter* sp., *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Myroides* sp. y *Brevibacterium* sp.

De acuerdo con el análisis molecular de los perfiles de electroforesis en gel de gradiente desnaturante (PCR-DGGE) de las tres áreas de desecho de *A. cephalotes*, se encontraron diferencias en las comunidades bacterianas presentes en la fracción cultivable (FC, ADN obtenido después del cultivo) y en la fracción total (FT, ADN extraído directamen-

te del área de desecho). El enfoque de cultivar las bacterias antes de la identificación, puede haber introducido un sesgo desconocido en el muestreo al no considerar las bacterias que no se han cultivado. Sin embargo, en la fracción total se encontraron similitudes superiores al 60 % entre los perfiles de los tiempos (0 y 15 días) para dos de las áreas de desecho (1H y 3H), que representa una comunidad muy relacionada al ser las muestras de los nidos artificiales. Es importante destacar que el material de la cámara de desecho está sometido a procesos de descomposición de hormigas muertas y del suelo presente y donde la comunidad microbiana está involucrada en estos procesos.

Los filotipos encontrados en este estudio han sido reportados en diferentes órdenes de insectos, entre los que se encuentran *Periplaneta americana* L., 1758 (Fang *et al.* 2013), *Solenopsis invicta* Buren, 1972 (hormiga roja) (Lee *et al.* 2008), escarabajos xilófagos (Cardoza *et al.* 2009) y en *Atta sexdens* L., 1758 (Van Borm *et al.* 2002). Lo que sugiere una microbiota facultativa que se encuentra en el entorno local de los insectos y que podría estar relacionada con procesos de nutrición (Stoll *et al.* 2007; Lam *et al.* 2009; Chavshin *et al.* 2012; Colman *et al.* 2012; Aylward *et al.* 2013b), sistema inmune del insecto (Jaffe *et al.* 2001; Cardoza *et al.* 2009), protección de los jardines (Little *et al.* 2006) o comunicación mediada por compuestos volátiles emitidos por las bacterias y utilizados como señalización por parte de los insectos (Lam

et al. 2009, Davis *et al.* 2013). A nivel de las áreas de desecho los resultados concuerda con el trabajo reportado por Scott *et al.* (2010), donde predominan bacterias que pertenecen a los filo Proteobacterias y Firmicutes y destaca en los depósitos la presencia de bacterias Gram-positiva y anaerobias. La función de la microbiota asociada posiblemente esté relacionada con procesos de degradación de compuestos complejos, como la lignina que no son utilizados en los jardines. Además, podría estar relacionada con procesos de detoxificación del material orgánico y convertir este sustrato en elementos ricos en nutrientes aprovechables por otros organismos y de esta forma ser reutilizados.

Los géneros encontrados en las áreas de desecho, coinciden con reportes realizados por diferentes investigadores que buscan consorcios bacterianos para biorremediación de suelos o aceleración de los procesos de compostaje. Chaudhary *et al.* (2015) reportan un consorcio bacteriano (conformado por *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Serratia* y *Streptomyces*) efectivo en la degradación de hidrocarburo aromático policíclico (HAP) este compuesto es un contaminante del suelo y se origina del petróleo y del carbón. En procesos de compostaje a partir de residuos de café, Vásquez de Díaz *et al.* (2010) citan ocho cepas que estarían participando en el proceso de degradación del material vegetal *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter koseri*, *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Stenotrophomona maltophilia*, *Cromobacterium* spp. y *Pseudomonas* spp.

El trabajo realizado por Anderson *et al.* (1993), señala a *Alcaligenes faecalis* como un microorganismo heterotrófico encontrado comúnmente en suelos y aguas, responsable de la mayor emisión de gases de nitrógeno en suelos anaerobios, se ha reportado participando significativamente en procesos de nitrificación, desnitrificación y en la fijación de nitrógeno, procesos importantes para la descomposición de materia orgánica y fertilidad del suelo. Por otra parte, esta especie (*A. faecalis* JBW4) ha sido reportada con actividad para degradar residuos de endosulfán (organoclorado) utilizado en la agricultura y prohibido en muchos países por su alta toxicidad y su alto potencial de bioacumulación y contaminación ambiental (Kong *et al.* 2013)

La identificación de las secuencias con similitud al género *Bacillus* en las muestras de la fracción total y la fracción cultivable (Tabla 1) es notable. Estas bacterias intervienen en los ciclos del carbono y nitrógeno, además, poseen la capacidad de degradar polisacáridos como almidón, pectina, celulosa, hemicelulosa y lignina componentes principales del material vegetal recolectado por las hormigas cortadoras de hojas (Scott *et al.* 2010; Cariello *et al.* 2007). La presencia de *Enterobacter* sp. coincide con el trabajo de Giraldo (2009) donde reporta la presencia de forma persistente y dominante asociada a diferentes castas, como aquella que realiza las labores en la cámara de desechos, esta bacteria junto a *Klebsiella* y *Pantoea* como simbiontes de las hormigas cultivadoras de hongos, podrían participar en la conversión de la biomasa de origen vegetal a energía utilizable (Aylward *et al.* 2012b), pero la alta presencia de *Enterobacter* en las áreas de desecho no ha sido estudiada. *E. cloacae* y *Burkholderia* sp. han sido reportadas por su capacidad de degradar herbicidas (Ngigi *et al.* 2012), lo que podría sugerir que en las áreas de desecho no solo se genera un ambiente que propicia que el material orgánico que no es utilizado por las hormigas se convierta en abono, sino que posiblemente algunas de las bacterias asociadas ayuden a la descontaminación del material de desecho que podría estar contaminados con productos agroquímicos.

Dentro de la gran familia de bacterias asociadas a los desechos de *A. cephalotes*, se encuentra el género *Myroides* sp. (KC800897) perteneciente al filum Bacteroidetes, se conoce que los miembros de este filum están presentes en la naturaleza y que comúnmente son aislados del suelo, desempeñando labores de oxigenación. No obstante, son también encontrados en sedimentos, aguas dulces y ecosistemas marinos (Yoon *et al.* 2006). Esta investigación identificó este género predominante en la fracción cultivable y muy relacionada con las secuencias encontradas en la FT del filum Bacteroidetes (KC800914-KC800915), los cuales pueden estar relacionado con procesos de nutrición en las hormigas, con acción antibacteriana y de resistencia a múltiples fármacos en los nidos y en las áreas de desecho. En el trabajo realizados por Jaffe *et al.* (2001) aislaron del intestino de *S. invicta* varias especies de bacterias representadas en los géneros *Myroides*, *Brevibacterium*, *Sphingobacterium*, *Alcaligenes*, *Stenotrophomonas*, entre otras y las relacionaron con la posible función de proporcionar nutrientes a las hormigas al estar implicadas en la síntesis de aminoácidos a partir de fuentes ricas en carbohidratos y nitratos. Además, *Myroides odoratimimus* aislado de moscas adultas se ha reportado con actividad antibacteriana e inhibiendo el crecimiento de bacterias procedentes de muestras clínicas, del ambientales y de otros insectos (Dharme *et al.* 2008)

Una observación notable fue la aparente abundancia de *Burkholderia* sp. en las muestra evaluadas en el tiempo cero (1H0, 2H0 y M0) (Tabla 1). La asociación de *Burkholderia* sp. también se ha encontrado en un análisis del jardín del hongo cultivado por *Atta sexdens rubropilosa*, mostrando una alta actividad antimicótica contra los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisoplae*, al hongo saprófito *Verticillium lecanii* y al parásito y principal enemigo del hongo simbionte *Escovopsis weberi* (Santos *et al.* 2004). No es extraño encontrar en la cámara de desecho algunas especies pertenecientes a este género, teniendo en cuenta que los niveles de contaminación deben ser altos, especialmente hongos parásitos y entomopatógenos; las hormigas encargadas de realizar labores de descarte posiblemente estén asociadas a bacterias con actividad antimicótica para su protección. Otras de las especies aisladas que podría estar relacionada con la protección de la colonia, pertenece al género *Serratia* (KC800912-KC800913) diferentes autores han reportado especies de este género con actividad antibiótica y antimicótica (O'Callaghan *et al.* 1996; McNeill *et al.* 2000; Osborn *et al.* 2002; Li *et al.* 2005; Ince *et al.* 2008; Lee *et al.* 2008; Giraldo 2009; Cardoza *et al.* 2009), aunque también se ha reportado algunas especies como entomopatógenas (O'Callaghan *et al.* 1996).

El enfoque de la ecología microbiana molecular se ha traducido en un aumento de la comprensión de las relaciones de los insectos con los microorganismos y su asociación en diversos ambientes está ganando mayor reconocimiento (Dillon y Dillon 2004). De particular relevancia es la hipótesis sobre las bacterias residentes en el área de desecho de las hormigas que podrían prevenir el desarrollo de patógenos por su actividad antimicrobiana, participar en la degradación de materia orgánica o como promotores de crecimiento de plantas ya sea directa o indirectamente. Farji-Brener y Medina (2000) y Farji-Brener y Werenkraut (2014) han revelado la importancia de estas áreas de desechos frente a la composición de semillas y raíces finas en suelos cerca de nidos de hormigas de las especie *A. cephalotes* y *A. colombica*. Esto debido a que el suelo de los nidos y espe-

cialmente las áreas de desecho son una fuente de nutrientes que favorece el crecimiento de las plantas. También, se ha demostrado que las plantas adquieren macronutrientes acumulados en los nidos de hormigas cortadoras, como el calcio, que es un macronutriente limitado en bosques tropicales y sabanas, así que las áreas de desechos no solo permiten concentrar nutrientes para las plantas sino que favorecen la distribución de macronutrientes a través de extensas áreas (Sternberg *et al.* 2007).

Nuestro trabajo revela la composición bacterina asociada a la cámara de desechos de colonias de hormigas *A. cephalotes* en condiciones de laboratorio y sugiere que las comunidades residentes están determinadas por la degradación de residuos de la planta y de las hormigas, se podría recomendar de acuerdo a la presencia de los géneros encontrados, su potencial para ser usado como abono para las plantas, sin embargo es necesario mayor investigación para dilucidar la función que pueden estar desempeñando.

Agradecimientos

Universidad Nacional de Colombia, proyecto DIME 20101008797.

Literatura citada

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- ATLAS, R. M. 2005. *Handbook of Media for Environmental Microbiology*. Second Edition. 510 p.
- ANDERSON, I. C.; POTH, M.; HOMSTEAD, J.; BURDIGE, D. 1993. A comparison of NO and N₂O production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas europaea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3525-33.
- AYLWARD, F. O.; BURNUM, K. E.; SCOTT, J. J.; SUEN, G.; TRINGE, S. G.; ADAMS, S. M.; BARRY, K. W.; NICORA, C. D.; PIEHOWSKI, P. D.; PURVINE, S. O.; STARRETT, G. J.; GOODWIN, L. A.; SMITH, R. D.; LIPTON, M. S.; CURRIE, C. R. 2012(a). Metagenomic and metaproteomic insights into bacterial communities in leaf-cutter ant fungus gardens. *The ISME Journal* 6 (9): 1688-701.
- AYLWARD, F. O.; CURRIE, C. R.; SUEN, G. 2012(b). The evolutionary innovation of nutritional symbioses in leaf-cutter ants. *Insects* 3 (1): 41-61.
- AYLWARD, F. O.; BURNUM-JOHNSON, K. E.; TRINGE, S. G.; TEILING, C.; TREMMEL, D. M.; MOELLER, J. A.; SCOTT, J. J.; BARRY, K. W.; PIEHOWSKI, P. D.; NICORA, C. D.; MALFATTI, S. A.; MONROE, M. E.; PURVINE, S. O.; GOODWIN, L. A.; SMITH, R. D.; WEINSTOCK, G. M.; GERARDO, N. M.; SUEN, G.; LIPTON, M. S.; CURRIE, C. R. 2013(a). *Leucoagaricus gongylophorus* produces diverse enzymes for the degradation of recalcitrant plant polymers in leaf-cutter ant fungus gardens. *Applied Environmental Microbiology* 79: 3770-3778.
- AYLWARD, F. O.; TREMMEL, D. M.; BRUCE, D. C.; CHAIN, P.; CHEN, A.; WALSTON DAVENPORT, K.; DETTER, C.; HAN, C. S.; HAN, J.; HUNTEMANN, M.; IVANOVA, N. N.; KYRPIDES, N. C.; MARKOWITZ, V.; MAVROMMATIS, K.; NOLAN, M.; PAGANI, I.; PATI, A.; PITLUCK, S.; DESHPANDE, S.; GOODWIN, L.; WOYKE, T.; CURRIE, C. R. 2013(b). Complete genome of Enterobacteriaceae bacterium strain FGI 57, a strain associated with leaf-cutter ant fungus gardens. *Genome Announcements* 1 (1): e00238-12.
- AYLWARD, F. O.; KHADEMPUR, L.; TREMMEL, D. M.; MCDONALD, B. R.; NICORA, C. D.; WU, S.; MOORE, R. J.; ORTON, D. J.; MONROE, M. E.; PIEHOWSKI, P. D.; PURVINE, S. O.; SMITH, R. D.; LIPTON, M. S.; BURNUM-JOHNSON, K. E.; CURRIE, C. R. 2015. Enrichment and broad representation of plant biomass-degrading enzymes in the specialized hyphal swellings of *Leucoagaricus gongylophorus*, the fungal symbiont of leaf-cutter ants. *PLoS ONE* 10 (9): e0139151.
- CARDOZA, Y.; VASANTHAKUMAR, A.; SUAZO, A.; RAFFA, K. 2009. Survey and phylogenetic analysis of culturable microbes in the oral secretions of three bark beetle species. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 131: 138-147.
- CARIELLO, M. E.; CASTAÑEDA, L.; RIOBO, I.; GONZÁLEZ, J. 2007. Endogenous microorganisms inoculant to speed up the composting process of urban swage sludge. *Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal* 7: 26-35.
- CHAUDHARY, P.; SAHAY, H.; SHARMA, R.; PANDEY, A. K.; SINGH, S. B.; SAXENA, A. K.; NAIN, L. 2015. Identification and analysis of polyaromatic hydrocarbons (PAHs)--biodegrading bacterial strains from refinery soil of India. *Environmental Monitoring and Assessment* 187 (6): 391.
- CHAVSHIN, A. R.; OSHAGHI MA FAU - VATANDOOST, H.; VATANDOOST H FAU - POURMAND, M. R.; POURMAND MR FAU - RAEISI, A.; RAEISI A FAU - ENAYATI, A. A.; ENAYATI AA FAU - MARDANI, N.; MARDANI N FAU - GHOORCHIAN, S.; GHOORCHIAN, S. 2012. Identification of bacterial microflora in the midgut of the larvae and adult of wild caught *Anopheles stephensi*: a step toward finding suitable paratransgenesis candidates. *Acta Tropica* 121: 129-134.
- COLE, J. R.; CHAI, B.; FARRIS, R. J.; WANG, Q.; KULAM, S. A.; MCGARRELL, D. M.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. 2005. The ribosomal database project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 33: D294-D296.
- COLMAN, D. R.; TOOLSON, E. C.; TAKACS-VESBACH, C. D. 2012. Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities? *Molecular Ecology* 21: 5124-37.
- COSTA, A. N.; VASCONCELOS, H. L.; VIEIRA-NETO, E. H. M.; BRUNA, E. M. 2009. Do herbivores exert top-down effects in Neotropical savannas? Estimates of biomass consumption by leaf-cutter ants. *Journal of Vegetation Science* 19: 849-854.
- CURRIE, C. R. 2001. A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. *Annual Review of Microbiology* 55: 357-80.
- CURRIE, C. R.; STUART, A. E. 2001. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 268:1033-1039.
- DAVIS, T. S.; CRIPPEN, T. L.; HOFSTETTER, R. W.; TOMBERLIN, J. K. 2013. Microbial volatile emissions as insect semiochemicals. *Journal of Chemical Ecology* 39: 840-59.
- DHARNE, M. S.; GUPTA, A. K.; RANGREZ, A. Y.; GHATE, H. V.; PATOLE, M. S.; SHOUCHE, Y.S. 2008. Antibacterial activities of multi drug resistant *Myroides odoratimimus* bacteria isolated from adult flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) are independent of metallo beta-lactamase gene. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 397-404.
- DILLON, R. J.; DILLON, V. M. 2004. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology* 49: 71-92.
- ESPEJO, R. T.; ESCANILLA, D. 1993. Detection of HIV1 DNA by a simple procedure of polymerase chain reaction, using "primer-dimer" formation as an internal control of amplification. *Research in Virology* 144: 1611-1617.
- FANG, W.; FANG, Z.; LIU, Z.; YUAN, J.; ZHANG, X.; PENG, H.; HONG, Y.; XIAO, Y. 2013. Phylogenetic analysis of bacterial

- community in the gut of American cockroach (*Periplaneta americana*). *Wei Sheng Wu Xue Bao* 53: 984-94.
- FARJI-BRENER, A. G.; MEDINA, C. A. 2000. The importance of where to dump the refuse: seed banks and fine roots in nests of the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* and *A. colombica*. *Biotropica* 32 (1): 120-126.
- FARJI-BRENER, A. G.; WERENKRAUT, V. 2014. A meta-analysis of leaf-cutting ant nest effects on soil fertility and plant performance. *Ecological Entomology* 40 (2): 150-158.
- GARCÍA, M. G.; MÁRQUEZ, M. A. G.; MORENO, C. X. H. 2016. Characterization of bacterial diversity associated with calcareous deposits and drip-waters, and isolation of calcifying bacteria from two Colombian mines. *Microbiological Research* 182: 21-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.09.006>.
- GIRALDO, C. 2009. Microbiota asociada a la casta obrera de la hormiga arriera *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae). Magister Scientiae. Departamento de Biología Facultad de Ciencias Universidad del Valle Cali. 81 p.
- HAEDER, S.; WIRTH, R.; HERZ, H.; SPITELLER, D. 2009. Candidin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 106: 4742-4746.
- HALL T., A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. 2010. *The Leafcutter Ants: Civilization by Instinct*; W. W. Norton and Company, Inc.: New York, NY, EEUU.
- HUANG, E. L.; AYLWARD, F. O.; KIM, Y. M.; WEBB-ROBERTSON, B. J.; NICORA, C. D.; HU, Z.; METZ, T. O.; LIPTON, M. S.; SMITH, R. D.; CURRIE, C. R.; BURNUM-JOHNSON, K. E. 2014. The fungus gardens of leaf-cutter ants undergo a distinct physiological transition during biomass degradation. *Environmental Microbiology Reports* 6: 389-395.
- INCE, I.; KATI, H.; YILMAZ, H.; DEMIR, I.; DEMIRBAG, Z. 2008. Isolation and identification of bacteria from *Thaumetopoea pityocampa* Den. and Schiff. (Lep., Thaumetopoeidae) and determination of their biocontrol potential. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 24: 3005-3015.
- JAFFE, K.; CAETANO, F.; SÁNCHEZ, P.; HERNÁNDEZ, J.; CARABALLO, L.; VITELLI-FLORES, J.; MONSALVE, W.; DORTA, B.; LEMOINE, V. 2001. Sensitivity of ant (*Cephalotes*) colonies and individuals to antibiotics implies feeding symbiosis with gut microorganisms. *Canadian Journal of Zoology* 79: 1120-1124.
- KOEPPEL, A.; PERRY, E. B.; SIKORSKI, J.; KRIZANC, D.; WARNER, A.; WARD, D. M.; ROONEY, A. P.; BRAMBILLA, E.; CONNOR, N.; RATCLIFF, R. M.; NEVO, E.; COHAN, F. M. 2008. Identifying the fundamental units of bacterial diversity: A paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 105: 2504-2509.
- KONG, L.; ZHU, S.; ZHU, L.; XIE, H.; SU, K.; YAN, T.; WANG, J.; WANG, J.; WANG, F.; SUN, F. 2013. Biodegradation of organochlorine pesticide endosulfan by bacterial strain *Alcaligenes faecalis* JBW4. *Journal of Environmental Sciences (China)* 25 (11): 2257-2264.
- LAM, K.; GEISREITER, C.; GRIES, G. 2009. Ovipositing female house flies provision offspring larvae with bacterial food. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 133: 292-295.
- LANGE, L.; GRELL, M. N. 2014. The prominent role of fungi and fungal enzymes in the ant-fungus biomass conversion symbiosis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (11): 4839-4851.
- LACERDA, F. G.; DELLA, T.; PEREIRA O. L.; PETERNELLI, L. A.; TÓTOLA, M. R. 2010. Mortality of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers in contact with colony waste from different plant sources. *Bulletin of Entomological Research* 100: 99-103.
- LEE, A. H.; HUSSENER, C.; HOOPER-BUI, L. 2008. Culture-independent identification of gut bacteria in fourth-instar red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren, larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 98: 20-33.
- LEONEL, D. A.; STERNBERG, S. L.; PINZON M. C.; MOREIRA, M. Z.; MOUTINHO, P.; ROJAS, E. I.; HERRE, E. A. 2007. Plants use macronutrients accumulated in leaf-cutting ant nests. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274: 315-321.
- LI, H.; MEDINA, F.; VINSON, S. B.; COATES, C. J. 2005. Isolation, characterization, and molecular identification of bacteria from the red imported fire ant (*Solenopsis invicta*) midgut. *Journal of Invertebrate Pathology* 89: 203-209.
- LITTLE, A. E.; MURAKAMI, T.; MUELLER, U. G.; CURRIE, C. R. 2006. Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. *Biology Letters* 2: 12-16.
- MCNEILL, M. R.; VITUM, P. J.; JACKSON, T. A. 2000. *Serratia marcescens* as a rapid indicator of *Microctonus hyperodae* oviposition activity in *Listronotus maculicollis* and potential application of the technique to host-specificity testing. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 95: 193-200.
- MOREIRA, A. A.; FORTI, L. C.; ANDRADE, A. P. P.; BOARETTO, M. A. C.; LOPES, J. F. S. 2004. Nest architecture of *Atta laevigata* (F. Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment Journal* 39: 109-116.
- MUELLER, U. G.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R.; ADAMS, R. M.; MALLOCH, D. 2001. The origin of the attine ant-fungus mutualism. *The Quarterly Review of Biology* 169-197.
- MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.
- NGIGI, A. N.; GETENGA, Z. M.; BOGA, H. I.; NDALUT, P. K.; 2012. Biodegradation of s-triazine herbicide atrazine by *Enterobacter cloacae* and *Burkholderia cepacia* sp. from long-term treated sugarcane-cultivated soils in Kenya. *Journal of Environmental Science and Health* 47 (8): 769-778.
- O'CALLAGHAN, M.; GARNHAM, M. L.; NELSON, T. L.; BAIRD, D.; JACKSON, T. A. 1996. The pathogenicity of *Serratia* strains to *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Invertebrate Pathology* 68: 22-27.
- OSBORN, F.; BERLIOZ, L.; VITELLI-FLORES, J.; MONSALVE, W.; DORTA, B.; RODRÍGUEZ LEMOINE, V. 2002. Pathogenic effects of bacteria isolated from larvae of *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 80: 7-12.
- RADEMAKER, J. W.; DE BRUIJN, F. 2004. Section 7 update: Computer-assisted analysis of molecular fingerprint profiles and database construction. pp. 3299-3347. In: Kowalchuk, G. A.; De Bruijn, F. J.; Head, I. M.; Akkermans, A. D.; Van Elsas, J. D. (Eds.). *Molecular Microbial Ecology Manual*. Springer Países Bajos.
- RIESENFELD, C. S.; SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. 2004. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annual Review of Genetics* 38: 525-552.
- ROMERO, J.; NAVARRETE, P. 2006. 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microbial Ecology* 51: 422-430.
- SAMBROOK, J. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SANTOS, A. V.; DILLON, R. J.; DILLON, V. M.; REYNOLDS, S. E.; SAMUELS, R. I. 2004. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *FEMS Microbiology Letters* 239: 319-323.

- SCOTT, J. J.; BUDSBERG, K. J.; SUEN, G.; WIXON, D. L.; BALSER, T. C.; CURRIE, C. R. 2010. Microbial community structure of leaf-cutter ant fungus gardens and refuse dumps. *PLoS One* 5, e9922.
- SILVA, A.; BACCI, M., J. R.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. 2006(a). Production of polysaccharidases in different carbon sources by *Leucoagaricus gongylophorus* Moller (Singer), the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* Linnaeus. *Current Microbiology* 53: 68-71.
- SILVA, A.; BACCI, M., J. R.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. 2006(b). Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *Microbiological Research* 161: 299-303.
- STERNBERG, L. D.; PINZON, M. C.; MOREIRA, M. Z.; MOUTINHO, P.; ROJAS, E. I.; HERRE, E. A. 2007. Plants use macronutrients accumulated in leaf-cutting ant nests. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274: 315-321.
- STOLL, S.; GADAU, J.; GROSS, R. O. Y.; FELDHAAR, H. 2007. Bacterial microbiota associated with ants of the genus *Tetraponera*. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1095-8312.2006.00730.x/abstract>. [Última revisión: Marzo 2007].
- SUEN, G.; SCOTT, J. J.; AYLWARD, F. O.; ADAMS, S. M.; TRINGE, S. G.; PINTO-TOMÁS, A. A.; FOSTER, C. E.; PAULY, M.; WEIMER, P. J.; BARRY, K. W.; GOODWIN, L. A.; BOUFFARD, P.; LI, L.; OSTERBERGER, J.; HARKINS, T. T.; SLATER, S. C.; DONOHUE, T. J.; CURRIE, C. R. 2010. An insect herbivore microbiome with high plant biomass-degrading capacity. *PLOS Genetic* 6: e1001129.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- VAN BORM, S.; BILLEN, J.; BOOMSMA, J. 2002. The diversity of microorganisms associated with *Acromyrmex* leafcutter ants. *BMC Evolutionary Biology* 2: 9.
- VÉLEZ A., C. A. 2008. Microbiota asociada a los productos de desecho de colonias artificiales de hormiga arriera, *Atta cephalotes* (Myrmecinae, Attini). Trabajo de grado, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia. 88 p.
- VÁSQUEZ DE DÍAZ, M. C.; PRADA, P. A.; MONDRAGÓN, M. A. 2010. Optimización del proceso de compostaje de productos post-cosecha (cereza) del café con la aplicación de microorganismos nativos. *Ciencias Biomédicas* 8 (14): 121-240.
- YOON, J.; MANEERAT, S.; KAWAI, F.; YOKOTA, A. 2006. *Myroides pelagicus* sp. nov., isolated from seawater in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 1917-1920.

Recibido: 23-oct-2014 • Aceptado: 18-sep-2016

Citación sugerida:

ORTIZ-REYES, A.; GIRALDO-JARAMILLO, T. M.; MORENO-HERRERA, C. X. 2016. Análisis molecular de las bacterias asociadas a los depósitos de desechos de *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Colombiana de Entomología* 42 (2): 162-170. Julio-Diciembre 2016. ISSN 0120-0488.