

TESIS DE LICENCIATURA

CONTROL DE HORMIGAS: MODULACIÓN DE LA INGESTA DE CEBOS POR BITREX, UN AMARGANTE COMERCIAL

Daniela Luciana Prina





Autora: Daniela Luciana Prina
Directora de tesis: Roxana Josens

Laboratorio de Insectos Sociales
(IFIBYNE-CONICET)
Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales

Marzo 2020



Índice

Resumen.....	6
Introducción	8
Insectos sociales	8
Recolección de alimentos en hormigas.....	9
<i>Camponotus mus</i>	10
<i>Linepithema humile</i>	11
Control de hormigas con cebos tóxicos	12
Bitrex	14
Objetivo.....	17
Materiales y métodos	18
Sitio de trabajo	18
Animales utilizados.....	18
Dispositivo experimental	19
Metodología.....	20
Selección y recolección de hormigas	20
Procedimiento.....	20
Evaluación de la motivación - puesta a punto	21
Tratamientos	22
Sobrevida	23
Variables medidas.....	23
Análisis estadístico	24
Resultados.....	26
Comportamiento de ingesta	26

<i>Camponotus mus</i>	26
<i>Linepithema humile</i>	32
Sobrevida	34
Discusión	35
Interpretación de los resultados obtenidos.....	35
Percepción del amargo	37
Modulación por motivación.....	40
Formulación de cebos comerciales.....	43
Conclusiones	45
Implicancias	46
Bibliografía	47
Anexo	61
Agradecimientos	62



Muchas especies de hormigas son combatidas por ser perjudiciales para el hombre y sus recursos. Hay gran consenso en considerar que la forma de control más amigable con el ambiente es mediante el uso de cebos tóxicos, es decir, un atrayente alimentario al que se le adiciona un compuesto letal para los insectos. Las hormigas recolectan este cebo como si fuera alimento, llevándolo al nido donde se distribuye entre toda la colonia.

Muchas de las hormigas que se procura controlar son nectívoras, por lo cual los azúcares son atrayentes efectivos para formular los cebos para estas especies. Para evitar el consumo accidental o ser ingerido por mascotas o niños, a los cebos se les suele añadir un amargante, benzoato de denatonio (Bitrex, nombre comercial), el cual es considerado el compuesto más amargo para el hombre hasta hoy descubierto. En humanos desencadena comportamientos aversivos en muy bajas concentraciones, por lo que es utilizado en el formulado de gran cantidad de productos comerciales de uso domiciliario, tal es el caso de los insecticidas.

En la presente Tesis de Licenciatura se estudió si la presencia de benzoato de denatonio en una solución azucarada afecta el comportamiento de ingestión de dicha solución en hormigas nectívoras.

Recolectoras de la hormiga *Camponotus mus* fueron evaluadas individualmente en su comportamiento de ingestión frente a una única solución azucarada, la cual podía contener Bitrex en el rango de concentraciones que se utiliza en los cebos comerciales (10 a 80 ppm) o bien, podía no contener amargante (control). Se analizó si las respuestas variaban con el estado motivacional de la hormiga, modulando la motivación a través de restricciones en la alimentación de la colonia.

Asimismo, se analizó la sobrevida, para evaluar algún posible efecto en la mortalidad debido a la ingesta de benzoato de denatonio.

Finalmente, y teniendo en cuenta que no todas las hormigas responden de igual manera ante los compuestos, se realizó un ensayo con otra especie de hormiga, *Linepithema humile*, para verificar si la concentración de Bitrex afectaba su comportamiento de manera similar.



Se encontró una contundente dependencia de la ingesta con la concentración de amargante utilizada, como así también con el grado de motivación del nido. Las hormigas con baja motivación rechazaron todas las soluciones con Bitrex, aun las de baja concentración. Las hormigas con alta motivación ingirieron similar cantidad de solución de 10 ppm de Bitrex y de control, pero no soluciones con concentraciones más altas. Solo hormigas con un ayuno extremo y muy alta motivación, aceptaron las soluciones con Bitrex. No se observó mortalidad diferencial entre individuos expuestos a los diferentes tratamientos.

La respuesta de *L. humile* fue similar, rechazando las soluciones con altas concentraciones de Bitrex.

A partir de los resultados podemos concluir que el benzoato de denatonio resultó una sustancia amarga disuasoria de la ingestión, la primera hasta ahora evaluada en ensayos de percepción en hormigas. Este efecto disuasor es dosis dependiente: a mayor concentración, mayor rechazo. La respuesta de rechazo es modulada por la motivación del insecto. Tal como era de esperar, el Bitrex no afecta la sobrevivencia de las hormigas. Dado que la efectividad de los cebos radica en que éstos sean aceptados y muy consumidos por las hormigas, resulta fundamental reducir al mínimo la concentración de Bitrex para que los cebos no disminuyan su eficacia.





Introducción

Insectos sociales

Los insectos son invertebrados del filo de los artrópodos, siendo el grupo de animales más diverso de la tierra, con aproximadamente un millón de especies descritas (Zhi-Qiang Zhang, 2011), comprendiendo más del 70% de las especies conocidas de animales en el mundo (Chapman, 2009). Asimismo, presentan gran diversidad de estrategias de vida, siendo la eusocialidad una estrategia altamente exitosa, debido a la división del trabajo y comportamientos sumamente complejos (Hölldobler y Wilson, 1990).

La eusocialidad es el nivel más alto de organización social que se puede encontrar en los animales. Ejemplos de insectos sociales son las hormigas, las termitas, algunas especies de avispas y de abejas. La organización eusocial de las colonias se caracteriza fundamentalmente por:

- Solapamiento generacional: en un nido conviven, al menos, dos generaciones de individuos distintas.
- Cuidado compartido de las crías: los adultos se organizan en el cuidado de las larvas y huevos, atendiendo crías que no son propias.
- División de trabajo: distintos individuos se especializan en distintas tareas, habiendo una fuerte división entre individuos reproductivos -los “reales”- y no reproductivos parcial o totalmente estériles -las “obreras”-. Las primeras están compuestas por reinas y machos cuya tarea en la colonia se limita exclusivamente a la reproducción, mientras que las obreras se ocupan de realizar diferentes tareas específicas dentro y fuera del nido, relativas al mantenimiento y crecimiento de la colonia. Asimismo, la repartición de estas tareas suele variar con la edad de la obrera: las más jóvenes se encargan del cuidado y alimentación de las larvas, huevos, pupas y reinas, mientras que las obreras más longevas se encargan de las tareas en el exterior que implican mayor riesgo y exposición, como la construcción y mantenimiento del nido, defensa del mismo y recolección de recursos (Hölldobler y Wilson, 1990).



La organización global de las tareas que realiza la colonia no es jerárquica, sino que se basa en las decisiones de cada individuo y en la comunicación entre ellos. Así se van realizando las tareas necesarias en base al requerimiento de toda la colonia como una unidad funcional (Seeley, 1989; Hölldobler y Wilson, 2008; O'Donnell y Bulova, 2007). De este modo, también en la recolección de alimento, las obreras toman decisiones de forma descentralizada, donde las respuestas colectivas surgen a partir de las respuestas individuales ante estímulos provenientes de la interacción con otros individuos o del medioambiente.

Recolección de alimentos en hormigas

Las hormigas pueden tener distintos hábitos alimentarios. En términos generales, pueden ser nectívoras, granívoras, predadoras, carroñeras, omnívoras y fungívoras (Hölldobler y Wilson, 1990; Lach et al., 2010). Sin embargo, la dieta y el balance nutricional pueden variar dentro de una especie de acuerdo al entorno ecológico, momento del año, etc (Davidson, 1997; Dussutour y Simpson, 2008; Kay, 2002; 2004; Lach et al., 2010). Muchas especies de hormiga recolectan soluciones azucaradas de manera oportunista, pero solo aquellas que se especializan en este tipo de alimentación son llamadas *hormigas nectívoras*. Éstas pueden recolectar carbohidratos de nectarios extraflorales y de exudados de hemípteros fitófagos (pulgones, cochinillas, membrácidos), ocasionalmente de nectarios florales o de heridas en las partes verdes de plantas (Blüthgen et al., 2004). Para las hormigas, estos recursos son fuentes, principalmente, de glucosa, sacarosa y fructosa y -en menor proporción- de aminoácidos (Baker et al., 1978; Lawton y Heads, 1984; Hölldobler y Wilson, 1990).

La recolección de néctar está dada por un pequeño porcentaje de los individuos de la colonia. Al visitar una fuente de néctar, las hormigas forrajeras lo ingieren y trasladan dentro de su buche hacia el nido donde lo descargan para ser distribuido entre los miembros de la colonia. La hormiga que retorna de la fuente (dadora) regurgita el néctar ingerido exponiendo una gota entre sus piezas bucales, de donde ingieren una o varias receptoras, luego de lo cual la dadora queda “vacía” para volver a la fuente de alimento.

Con este mecanismo de intercambio de alimento boca a boca (trofalaxia), el néctar que va entrando al nido es recibido y -también por trofalaxia- va siendo distribuido entre todos los miembros de la colonia.



Diversos estudios han abordado el comportamiento individual de ingestión de soluciones azucaradas (Detrain y Prieur, 2014; Dussutour y Simpson, 2008; Falibene y Josens, 2008; Josens et al., 1998; Schilman y Roces, 2003) y el reclutamiento en distintas especies de hormigas (Mailleux et al., 2000; Mailleux et al., 1998). Estos comportamientos se modulan por la motivación del individuo, la cual actúa en forma reversible según la necesidad de la colonia: a mayor necesidad de un recurso, mayor motivación individual por conseguirlo (Mc Farland, 1971; Josens et al., 1998; Josens y Roces, 2000; Mailleux et al., 2006). En el caso del néctar, las propias características de este recurso también afectarán la motivación individual de una hormiga por ingerirlo.

La riqueza que pueden obtener las hormigas de una fuente de néctar está relacionada con variados factores, entre ellos, la concentración de azúcar, la tasa de producción del mismo y su viscosidad (Medan y Josens, 2005; Lois-Milevicich, 2016). Estos factores afectan la valoración de la fuente de alimento por parte de una hormiga nectívora y, por ende, su aceptación, tiempo de ingesta y otras variables comportamentales de alimentación (Josens et al., 1998; Medan y Josens, 2005; Paul y Roces, 2003; Schilman y Roces, 2003).

Camponotus mus



Fig. 1. Obreras de *Camponotus mus* en el contexto experimental del presente trabajo.

Fuente: Diario La Nación. Crédito: Vera Rosemberg.

Camponotus mus es una especie de hormiga conocida vulgarmente como “hormiga carpintera”. Su tamaño varía ampliamente, registrando en obreras una variación entre 2 y 10 mm y pesando entre 2 a 25 mg (Medan y Josens, 2005; obs. pers.). Está ampliamente distribuida en América del Sur, encontrándose en algunas regiones de Argentina, Uruguay, Paraguay, Bolivia y sur de

Brasil. Habitan tanto regiones secas como húmedas y en lugares tanto abiertos como boscosos (Kusnezov, 1951). Anida en troncos podridos, secos o aún vivos, en ramas huecas o en cañas; pero también puede hacerlo en grietas y bajo piedras. En las ciudades es muy común verlas anidando bajo los techos de tejas, en grietas ubicadas en los cimientos de las construcciones, vigas y postes de luz, por lo cual suelen ser muy combatidas. A pesar de la gran diversidad de hábitats y condiciones ambientales donde se las encuentra, al igual que

otras especies de su género, conservan invariantes las características morfológicas dentro del grupo; sin embargo, son capaces de adaptar su nidificación según el medio ambiente en el que se encuentran (Kusnezov, 1951).

Como la mayoría de su género, se trata de una especie nectívora; no obstante, la demanda de proteínas de la colonia (principalmente mantenimiento de cría) la satisfacen mediante la recolección de insectos muertos, aunque pueden ser predadoras (Hölldobler y Wilson, 1990).

Particularmente, los miembros del género *Camponotus*, distribuido mundialmente, poseen un proventrículo altamente desarrollado, una adaptación morfológica para la retención de alimentos líquidos en el buche (Eisner, 1957). Así es que las recolectoras individuales transportan al nido grandes cargas de carbohidratos en el buche (Levieux y Louis, 1975), donde, asimismo, mantienen las reservas de la colonia. Es por ello que al conjunto de buches de las obreras se lo conoce como “estómago social”.

Linepithema humile



Fig. 2. Obreras de *Linepithema humile* alimentándose de una solución azucarada en un contexto domiciliario.

Linepithema humile (Hymenoptera: Formicidae), también conocida como “Hormiga Argentina” es una especie nativa de gran parte de Argentina, Paraguay, Uruguay y sur de Brasil (Wild, 2004). Sin embargo, su gran éxito como invasora permitió a la especie la expansión a todos los continentes exceptuando la Antártida, en algunos casos, hace más de cien años, incluyendo hábitats totalmente distintos al nativo (Newell, 1908; Silverman y Brightwell, 2008). Se ha convertido en una plaga a

escala mundial, produciendo perjuicios en ambientes agrícolas por su asociación a hemípteros y como molestias dentro del hogar en ambientes urbanos. Además, su presencia está asociada a una disminución de otras especies de hormigas (Erickson, 1971; Human y Gordon, 1996; Kennedy, 1998) y variaciones en la proporción de otros invertebrados (Cole et al., 1992; Holway, 1998). Incluso en ecosistemas naturales desplaza especies nativas e impacta directa- o indirectamente en otros organismos incluyendo vertebrados (Alvarez-Blanco et al., 2017; Suarez y Case, 2002).



Por estas razones es una de las plagas de hormigas más estudiadas en el mundo (Passera, 1994; Gordon y Heller, 2014) y está incluida en la lista de las 100 especies exóticas invasoras más dañinas del mundo (Global Invasive Species Database 2020).

En su hábitat natural en el rango nativo, *L. humile* forma una red de nidos -conectados o no- que puede alcanzar áreas de hasta 13 o 14 hectáreas y longitudes de más de 1.5 kilómetros (Heller 2004), longitudes menores son alcanzadas en ambientes urbanos en el rango nativo (Sola, 2015). Sin embargo, en poblaciones introducidas se sobreexpresa la unicolonialidad, formando “supercolonias” que abarcan inmensas extensiones de cientos o, incluso, miles de kilómetros con numerosos nidos asociados entre sí, sin la presencia de agresión entre individuos (Tsutsui et al., 2000). Estas características constituyen algunas de las claves de su éxito como invasoras, permitiéndole a la especie alcanzar altas densidades y superioridad numérica en el rango de invasión (Holway, 1998, 1999; Suarez et al., 1998).

Pocos trabajos se han realizado con *L. humile* a nivel individuo evaluando la preferencia por soluciones de sacarosa de diferentes concentraciones (Falibene y Josens, 2011; Sola et al., 2013; Sola y Josens, 2016); en general, estos estudios se hacen con subnidos o colonias enteras (Silverman y Roulston, 2001; Silverman y Brightwell, 2008), quizás debido a su dificultosa manipulación dado su pequeño tamaño (3-4 mm), lo que hace que las observaciones y mediciones individuales sean engorrosas o requieran condiciones experimentales particulares.

Control de hormigas con cebos tóxicos

Mediante la alteración masiva de ecosistemas naturales, los humanos intervienen en la distribución, riqueza y abundancia de otras especies. Al transformar ambientes naturales en urbes o agroecosistemas, gran cantidad artrópodos pueden adaptarse a estos ambientes antropizados y generar algún daño hacia el hombre o sus recursos, considerándose -según su impacto- como plagas (Dent, 2000).

Muchas especies de hormigas son consideradas plagas domésticas, forestales, estructurales y/o agrícolas (Beatson, 1972; Fowler et al., 1993; Bueno y Campos-Farinha, 1999; Moreira et al., 2005; Olaya-Masmela et al., 2005; Oi, 2008; Santos et al., Rust y Su, 2012; 2009, Smith, 1965), por lo cual son combatidas con diferentes productos.

Hoy en día existe una conciencia general sobre la necesidad de limitar la liberación de pesticidas al medio ambiente. Con respecto al control de hormigas, hay gran consenso en considerar que la forma de control más amigable con el ambiente es mediante el uso de cebos tóxicos. Asimismo, bien utilizado puede ser la forma más efectiva (Josens et al., 2014; Greenberg et al., 2006; Greenberg et al., 2017), ya que son las propias hormigas las que

llevan el veneno hacia el nido, por lo cual no es necesario tener que localizarlo. Actualmente, distintos cebos hormiguicidas se comercializan libremente, siendo el formato más frecuente – al menos, en Argentina- un gel contenido en una jeringa.

Estos cebos comerciales consisten, fundamentalmente, en un atractante alimentario al que se le adiciona un compuesto letal para los insectos. Así, las hormigas lo recolectan, cual si fuera alimento, llevándolo al nido donde el cebo se distribuye entre toda la colonia, evitando la aplicación indiscriminada de sustancias tóxicas (Stringer et al., 1964; Silverman y Brightwell, 2008). Las soluciones azucaradas resultan un cebo adecuado para gran parte de las hormigas urbanas, ya que muchas especies son nectívoras (Gibson y Scott, 1989; Josens et al., 2014). Sin embargo, existen factores intrínsecos que pueden interferir con la eficiencia de los cebos, tales como las propiedades físico-químicas o su formulado (Lee, 2008). Por lo cual, si concebimos una estrategia de control químico introduciendo el tóxico al nido por medio de las obreras, resulta fundamental entender qué características del cebo (compuestos atractantes, viscosidad, concentración del tóxico, etc.) promueven una mayor entrada de cebo al nido. Al igual que lo mencionado para el comportamiento de recolección en general, son pocos los estudios que han abordado la ingestión de cebos tóxicos focalizándose en el individuo (Hooper-Bui y Rust, 2001; O'Brien y Hooper-Bui, 2005; Sola et al., 2013; Josens et al., 2017). La aceptación y el consumo de cebos tóxicos son generalmente analizados a nivel grupal o de la colonia toda (Klotz et al., 2000; Silverman y Roulston, 2001; Rust et al., 2004; Nyamukondiwa y Addison, 2011).

Existen en el mercado nacional e internacional diferentes cebos comerciales destinados al uso domiciliario para combatir hormigas. Sin embargo, factores intrínsecos propios de su formulación pueden interferir en la aceptación de los mismos y, por lo tanto, en su eficacia. La formulación se refiere a la mezcla de compuestos que se realiza para sacar un cebo al mercado. Eso incluye no solo el atractante (azúcar) y el compuesto activo (tóxico), sino que, la mayoría de las veces, también distintos aditivos para cumplir otras funciones (mejorar su conservación, aplicación, estabilidad, durabilidad, seguridad, etc.). Estos aditivos presentes pueden afectar las propiedades físicas o la palatabilidad de los cebos, pudiendo generar respuestas aversivas o disuasoras de la ingesta (Lee, 2008). Uno de los compuestos aditivos clave en los cebos comerciales es un amargante. Su función es evitar la ingesta accidental, particularmente por niños pequeños y mascotas.

En varios insectos se ha demostrado la percepción de lo amargo y la existencia de receptores en sensillas gustativas, que intervienen en la detección de estos compuestos (Yarmolinsky et al., 2009; de Brito Sanchez 2011). En hormigas la percepción del amargo no está estudiada, sin embargo, la quinina se ha usado en protocolos de condicionamiento para estudios de aprendizaje asociativo, dando por supuesto que sería un estímulo aversivo (Josens et al., 2009; Guerrieri y d'Ettorre, 2010; Dupuy et al., 2006; d'Ettorre et al., 2017).

Bitrex



Fig. 3. Símbolo de identificación de productos que contienen Bitrex.

separado que actúan sobre los receptores del gusto. Es una sustancia inocua para el ser humano que se añade a los productos para el hogar y el jardín con el objetivo de garantizar que, si un niño o un animal intentara ingerirlo, lo escupiría inmediatamente antes de poder intoxicarse (de la página oficial www.Bitrex.com).

El benzoato de denatonio puede ser detectado por humanos como sustancia aversiva desde concentraciones de 10 ppm (0,001% p/p) (Kleinkauf et al. 1999; Kaukeinen & Buckle, 1992; www.Bitrex.com). Sin embargo, parecería que, a bajas concentraciones como esta, no puede garantizar la evitación de la ingesta. Estudios mostraron que 7/30 niños entre 17 y 36 meses consumen jugo de naranja adicionado con Bitrex 10ppm una segunda vez (Sibert et al., 1991). Por otro lado, trabajos similares realizados con diluciones de detergente, muestran que solo el 2,5% de los niños entre 24 y 27 meses vuelve a ingerir una solución con Bitrex 11ppm. De ellos, la mayoría ingirió solo un sorbo y el resto, no más de tres (Berning et al., 1982). A su vez, trabajos en humanos adultos a los que se les suministró cebos sólidos sin tóxico con benzoato de denatonio 10ppm, muestran que, de 22 individuos, la mayoría de ellos le dio un valor hedónico de 7 puntos en una escala del 1 al 7 (1 = máxima aceptación, 7 = máximo rechazo) (Kaukeinen et al., 1992). Por lo tanto, a concentraciones aproximadas a 10ppm, el benzoato de denatonio funcionaría como prevención, pero no como solución para garantizar la evasión de la ingesta.

El benzoato de denatonio fue descubierto hace 60 años (Payne 1988) y es el compuesto más amargo para el hombre en el mundo hasta hoy conocido según el *Guinness Book of Records*. Se lo comercializa bajo el nombre de Bitrex®, pero también se lo encuentra como Evitex® (y -quizás- otros). El nombre químico completo es benzoato de fenilmetil-[2- [(2,6-dimetilfenil)amino]-2-oxoetil]-dietilamonio y su estructura se muestra en la fig. 4. Se asemeja químicamente a sustancias amargas naturales como la quinina al tener una estructura molecular con elementos cargados por

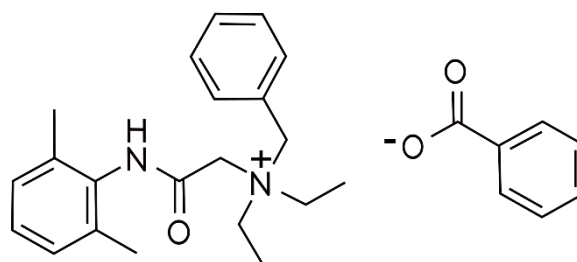


Fig. 4. Estructura química del benzoato de denatonio

La percepción del benzoato de denatonio es altamente dependiente de los componentes específicos de la fórmula del producto en cuestión, particularmente de los endulzantes (Kaukeinen et al., 1992), funcionando de manera diferencial entre distintas especies. Mientras que la adición de benzoato de denatonio puede ser efectiva en la reducción de la ingesta accidental por humanos u otras especies no target, su efectividad no es universal. Algunos autores encontraron que varios animales pueden tener diferente sensibilidad al benzoato de denatonio. Por ejemplo, al agregarlo a la cebada redujo significativamente el consumo de la misma por el ratón de campo (*Apodemus sylvaticus*), pero no tuvo efectos en la cantidad de pupas de mosca consumidas por topillo rojo (*Myodes glareolus*) (Kleinkauf et al., 1999). A su vez, las ardillas de bolsillo (*Thomomys talpoides*) no evitaron el consumo de semillas de pino que fueron tratadas con benzoato de denatonio (Witmer et al., 1997).

La adición de Bitrex a un insecticida puede ser una buena herramienta para evitar la ingesta humana; pero, asimismo, podría resultar también un disuasor de la ingesta del producto por parte del insecto target.

En insectos, la detección del benzoato de denatonio depende de su concentración (Ramaswamy et al. 1992; Perera et al. 2000). Larvas de polilla *Plutella xylostella* interrumpieron su comportamiento alimenticio con concentraciones de 250ppm añadidas al sustrato (Perera et al., 2000). En avispas (*Vespula germanica*) se vio que hay un descenso significativo del consumo de cebos con benzoato de denatonio en concentraciones mayores a 10ppm (Sackmann et al., 2010). Sin embargo, en un trabajo realizado a campo en hormigas -en el desarrollo de una patente- se observó que un cebo comercial conteniendo 100ppm de benzoato de denatonio resultó efectivo para el control de hormigas carpinteras de Nueva



Fig. 5. Algunos ejemplos de cebos comerciales para hormigas que contienen Bitrex.

Jersey (*Camponotus pennsylvanicus* y *C. ferrugineus*), las cuales aceptaron el cebo incluso cuando el mismo estaba colocado después de uno control (sin benzoato de denatonio) o cuando el control ya había sido consumido (Faehl, 2001). Este último estudio, hecho en campo, sugiere que la presencia del amargante no es percibida por las hormigas ya que no disminuye para nada su aceptación.

En el marco del presente trabajo, realizando una búsqueda web general y revisión de reportes ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica - Argentina) se encontraron concentraciones de Bitrex entre 0.001% y 0.008% (p/p) para hormiguicidas de venta al público general; esto es, entre 10 y 80 ppm.



Objetivo



El objetivo del presente trabajo es estudiar el comportamiento de ingestión de cebos azucarados adicionados con Bitrex en hormigas nectívoras, con el fin de responder las siguientes preguntas:

- ¿Las hormigas pueden percibir el Bitrex?
- Las concentraciones de Bitrex utilizadas comercialmente, ¿modifican la aceptación de los cebos azucarados? Si la modifican, ¿de qué manera lo hacen? ¿Puede esa respuesta ser modulada?
- ¿El Bitrex afecta la sobrevida de las hormigas que lo consumen?

Para estos estudios, se utilizará como modelo experimental a la hormiga *Camponotus mus*. Además, se estudiará el comportamiento de ingestión con otra especie, *Linepithema humile*, para evaluar si el patrón de respuesta es similar.

Las hipótesis que se proponen son las siguientes:

- El agregado de Bitrex a los cebos azucarados en concentraciones halladas comercialmente reduce la aceptación de los mismos por parte de las hormigas.
- El rechazo de los cebos con Bitrex se modula por la motivación del insecto.
- La adición de Bitrex no genera una reducción en la sobrevida de los individuos que ingieren la solución.





Materiales y métodos

Sitio de trabajo

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Insectos Sociales (IFIBYNE – UBA) ubicado en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (34° 32' S, 58° 26' O). Todos los ensayos, para ambas especies, se realizaron entre marzo-abril de 2018 y enero-marzo de 2019.

Animales utilizados

Se trabajó con cuatro colonias de la hormiga *C. mus*, las cuales fueron colectadas en Mariano Acosta (Merlo- Buenos Aires) en agosto de 2018. Cada colonia fue colocada en un



Fig. 6. Nido experimental de *Camponotus mus*.

Fuente: Diario La Nación. Crédito: Vera Rosemberg.

recipiente plástico, donde se le proveyó de agua, alimento y acondicionamiento para que el nido se desarrolle dentro del laboratorio. Para tener más control sobre las condiciones del nido, de esas colonias grandes se extrajeron subnidos más pequeños los cuales fueron colocados en contenedores plásticos de 28 x 29 x 14 cm³ o 29 x 24 x 11 cm³, a los cuales se los dejó 5 meses de aclimatación y acostumbramiento antes de llevar a cabo los experimentos.

Cada contenedor plástico constaba de un piso de yeso, paredes pintadas con flúon para evitar fugas de individuos, un refugio construido en madera y acrílico donde se guarecía la mayoría de obreras y cría y un puente donde se subían mayormente hormigas exploradoras (fig. 6).

Los nidos fueron mantenidos bajo ciclos naturales de luz/oscuridad a temperatura constante



(25 ± 2 °C) (condiciones estandarizadas de cría extraídas de Josens et al., 1998) y humedad que varió entre 55 y 78% durante la realización de los experimentos.

Los animales podían moverse libremente dentro del contenedor, donde se les proveyó agua *ad libitum* y una dieta variada en proteínas y azúcares (insectos, miel de abeja, agua azucarada, carne picada). Antes de cada experimento se interrumpió el suministro de carbohidratos para manipular la motivación de las recolectoras.

En el caso de *L. humile*, se trabajó con un nido colectado en terrenos linderos al lugar de trabajo, del cual se extrajo un subnido en un recipiente de acrílico de 29 x 24 x 11 cm³ con las mismas condiciones que se describe para *C.mus*.

Dispositivo experimental

Para estudiar el comportamiento de ingesta se utilizó un dispositivo experimental como muestra la fig. 7. El mismo consta de dos puentes, uno primario (donde está el cebo) y otro de transferencia (solo de paso). Cada puente se construye con un recipiente lleno de agua para evitar fuga de animales, una base, un palillo y una plataforma donde los animales se desplazaban y en la cual el puente primario contenía en su extremo un acrílico intercambiable donde se colocaba una gota (aproximadamente 0.1 ml) de solución, lo que implica una fuente de alimento *ad libitum* para un individuo.

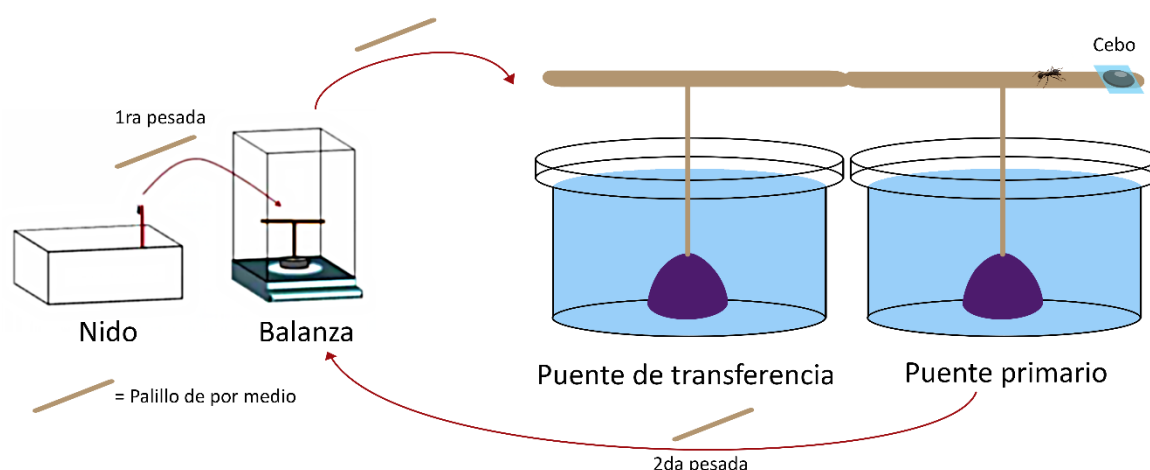


Fig. 7. Esquema del dispositivo experimental y metodología empleada en el presente trabajo. Las hormigas eran recogidas del nido mediante un palillo de madera, transportadas y pesadas en la balanza de precisión y luego colocadas en el puente de transferencia. De allí pasaban al puente primario, donde disponían del cebo. Después de la ingesta, retornaban al puente de transferencia, donde eran recogidas para la segunda pesada.

Las relaciones de tamaño de la figura no son reales.

Para estudiar la sobrevida, se acondicionaron recipientes cilíndricos de 5 cm de radio donde se colocó yeso en los pisos, flúon en las paredes y tapas herméticas plásticas con agujeros para evitar escapes, pero permitir la respiración. A estos recipientes se las denominó “guaridas de sobrevida”.

Metodología

Selección y recolección de hormigas

Para realizar todos los ensayos, se seleccionaron hormigas cuando las mismas estaban transitando por los puentes de los nidos. Se le colocó un palillo de madera de 25 cm adjunto al puente por donde la hormiga continuó su trayectoria, cuidando, así, que el animal no se altere y no libere feromona de alarma en los materiales de trabajo. El palillo de madera fue el instrumento con el que se transportó a las hormigas de un dispositivo al otro durante todo el experimento.

Procedimiento

C.mus

Las hormigas seleccionadas fueron colocadas en un frasco de acrílico para ser pesadas antes de subirlas al puente (peso inicial, P0). La balanza utilizada fue AG285, resolución 0,01 mg; Mettler Toledo, Ohio, USA. Para cada unidad experimental se realizó el siguiente procedimiento: luego del pesaje, se indujo a la hormiga a subir a la varilla de madera para luego depositarla en el puente de transferencia. Cuando la hormiga pasó al puente primario, el de transferencia se retiró para impedir el retorno y se esperó a que la hormiga llegue al cebo. Durante la alimentación, se midió el tiempo de ingesta y el número de pausas con el programa JWatcher v1.0. Luego de la ingesta (o rechazo), la hormiga retornó su camino hacia el puente de transferencia (el cual volvió a estar disponible). Una vez cruzado el puente de transferencia, se retiró el primario y se indujo a la hormiga a subir al palillo de madera para realizar el segundo pesaje (peso final, Pf). A continuación, se hizo subir a la hormiga al palillo nuevamente para ser depositada en su destino final, la guarida de sobrevida.



Cabe aclarar que la existencia del puente de transferencia se debió a que, de haber un solo puente, en ocasiones, las hormigas volvían a la fuente de alimento cuando ya se había dado por concluida la medición del tiempo, lo cual generaba irregularidades en la toma de datos. Por ende, se dio por finalizada la medición una vez que la hormiga cruzó desde el puente primario al puente de transferencia, momento en el cual se le apartó el puente primario y la oportunidad de volver a ingerir solución.

L. humile

Para *L. humile* se realizó el mismo procedimiento descrito para *C. mus* con la excepción de que las hormigas no pasaron por la balanza. Dada su pequeña masa corporal, la medición de un individuo resulta compleja de realizar, por lo cual se optó por no trabajar con esta variable en esta especie.

Evaluación diaria de la motivación previa a la toma de datos

C. mus

Cada día de experimentación se utilizó un único nido el cual era condicionado (restricción de alimento) los días previos para modular la motivación de las recolectoras. Con el fin de evaluar la motivación, al comienzo del día de trabajo se seleccionaron 10 hormigas, las cuales fueron colocadas en los puentes para medir la aceptación de una solución de sacarosa 10% m/v. Se tomó el siguiente criterio en base a las observaciones:

- Motivación Baja: 20 - 30% de rechazo
- Motivación Alta: 0 – 10% de rechazo y mayores tiempos de ingesta que los observados en motivación baja.

Con motivación Baja y Alta, el nido funcionaba con normalidad, en algunos había cría y no se observaba una mortalidad fuera de lo común.

En forma involuntaria, dos nidos fueron dejados demasiado tiempo en ayuno, observándose una gran mortalidad dentro de los mismos -alrededor del 50%, estimativamente-, muy baja actividad y nada de cría. Al ser evaluadas no tuvieron ningún rechazo. Considerando las características mencionadas, se consideró a este grupo como un estado diferente a los dos mencionados:

- Motivación muy alta (Moribundas): 0% de rechazo y se observa gran mortalidad dentro del nido y baja actividad.



Se ha considerado un rechazo cuando la hormiga hacía contacto con la solución, pero no la ingería; o bien cuando el tiempo en contacto con la solución era menor a 5 segundos. Si una hormiga exploraba el puente por más de 1 minuto sin hacer contacto con la solución, se descartaba la observación.

L.humile

Con *L.humile* se realizó la puesta a punto de modo similar a la de *C.mus*, pero dada la difícil manipulación del comportamiento de ingesta de esta especie, se trabajó solamente con un único grado de motivación que consistió en obtener más de 10% de rechazo (de un total de 10 hormigas) de solución azucarada 5% p/v.

Vale considerar que se intentó modular el comportamiento de ingesta con soluciones de mayor concentración de azúcar y/o sobrealimentando al nido horas antes del ensayo, consiguiendo, invariablemente, un 100% de aceptación. La obtención de rechazos de solución 5% p/v, por ende, es un indicador de reducción de la motivación normal del nido.

Tratamientos

Durante el presente trabajo, se le llamará “tratamientos” a las 5 soluciones de sacarosa 30% p/v con concentración creciente de Bitrex (benzoato de denatonio, proveedor Xiamen Fine Chemical) con las que se trabajó:

- B0: control, sin Bitrex,
- B1: 0.001% p/v (10 ppm) Bitrex,
- B2: 0.002% p/v (20 ppm) Bitrex,
- B4: 0.004% p/v (40 ppm) Bitrex,
- B8: 0.008% p/v (80 ppm) Bitrex.

El rango escogido resulta de las concentraciones utilizadas comercialmente, que van desde 10ppm hasta más de 80ppm.

Las soluciones fueron realizadas con sacarosa (D (+)-SACAROSA, 342,30 g/mol) y controladas por refractometría (refractómetro MA871, resolución 0,1 % p/p; Milwaukee, North Carolina, USA). La concentración de sacarosa fue 30 % porque es la concentración óptima para *C.mus* (Josens et al., 1998).

Para la preparación se utilizó una balanza de precisión (AG285, resolución 0,01 mg; Mettler Toledo, Ohio, USA) y vórtex y calor para la disolución del amargante. Se guardaron alícuotas en tubos eppendorf que fueron conservados en freezer. Cada día de trabajo, se utilizó una alícuota de cada concentración, las cuales fueron descartadas al final del ensayo. Estas soluciones fueron utilizadas como tratamientos para ambas especies. Tener en cuenta que, como se mencionó anteriormente, para las pruebas de motivación se utilizó sacarosa 5% con *L.humile* y sacarosa 10% con *C.mus*, pero los experimentos se realizaron con soluciones de sacarosa 30% + amargante con ambas especies.

Sobrevida

Cada día, luego de los ensayos, cada hormiga era colocada en una guarida de sobrevida. Se colocaron 5 hormigas en una misma guarida para cada tratamiento por día. Se registró el número de muertes a lo largo de los 15 días posteriores al ensayo. El hecho de apartar a las hormigas del nido permitió, además de la medición de la sobrevida, evitar la pseudorréplica. Se midió sobrevida para ambas especies y todos los tratamientos. En el caso de *C.mus*, se midió sobrevida para motivación Alta y Baja pero no para Moribundas por imprevistos durante la realización de los experimentos.

Variables medidas

C.mus

Se registraron las siguientes variables:

- Peso Inicial (P0): peso registrado antes de la ingesta.
- Peso Final: (Pf): peso registrado luego de la ingesta.
- Tiempo de ingesta: Tiempo de contacto de las mandíbulas de la hormiga con la solución. Si la hormiga hacía una pausa, se frenaba el registro y se continuaba al momento que la hormiga volvía a poner sus mandíbulas en contacto con el líquido.
- Número de pausas: Cantidad de veces que la hormiga comió, frenó y volvió a ingerir solución.

L.humile

Solamente se registró tiempo de ingesta y número de pausas, teniendo en cuenta que el tiempo de ingesta correlaciona con la masa de cebo ingerida (obs. del grupo de trabajo).

Análisis estadístico

C.mus

Peso inicial (P0): Se estudió si los pesos iniciales eran similares entre tratamientos para poder validar el resto de los análisis. Si los pesos iniciales llegaran a diferir entre tratamientos, podría ocurrir que, por ejemplo, la diferencia en la masa de cebo ingerida se deba a la cantidad de líquido que puede consumir una hormiga de gran tamaño frente a la menor cantidad que puede ingerir una hormiga pequeña. Los resultados, por lo tanto, estarían sesgados por los pesos iniciales.

Se la consideró variable no normal (Shapiro Wilk, $W = 0.91$, $p\text{-valor} = 3.75e^{-14}$). Se realizó un modelo lineal generalizado con distribución gamma (link: log) y un ANOVA de un factor comparando tratamientos y otro comparando motivaciones.

Masa de cebo ingerida relativa (DPrel): Dados los resultados obtenidos para los pesos iniciales, se decidió relativizar la masa de cebo ingerida, calculada como:

$$DPrel = \frac{(Pf - P0)}{P0} \times 100$$

Por lo tanto, los valores resultantes se interpretan como “qué porcentaje de su peso inicial comieron”.

Se la consideró variable no normal (test de Shapiro-Wilk: $W = 0.80$, $p\text{-valor} < 2.2e^{-16}$) y los modelos lineales no resultaron homocedásticos (glm, test de Levene: $F = 5.93$, $p\text{-valor} = 0.0001$). Se realizaron tests de Kruskal Wallis dentro de cada motivación y comparaciones múltiples a posteriori entre tratamientos utilizando el método de Dunn (Dunn, 1964), ajustando p-valores por Holm (Holm, 1979). Para las comparaciones entre motivaciones se realizó el mismo procedimiento.

Número de pausas: Se modeló con una distribución Poisson, como modelo lineal generalizado mixto (factor aleatorio: ID del individuo) con interacción entre tratamiento y motivación. Se realizó una prueba de Wald y comparaciones múltiples a posteriori con el método de Tukey.



Tiempo de ingesta: Se la consideró variable no normal (test de Shapiro-Wilk: $W = 0.81$, $p\text{-valor} < 2.2e^{-16}$) y los modelos lineales no resultaron homocedásticos (glm, test de Levene: $F = 3.62$, $p\text{-valor} = 0.006$). Se realizaron tests de Kruskal Wallis dentro de cada motivación y comparaciones múltiples a posteriori entre tratamientos utilizando el método de Dunn (Dunn, 1964), ajustando p-valores por Holm (Holm, 1979). Para las comparaciones entre motivaciones se realizó el mismo procedimiento.

L.humile

Tiempo de ingesta: Se la consideró variable no normal (test de Shapiro-Wilk: $W = 0.88$, $p\text{-valor} = 1.093e^{-09}$) y los modelos lineales no resultaron homocedásticos (glm, test de Levene: $F = 2.45$, $p\text{-valor} = 0.05$). Se modeló con una distribución gamma (link: log, factor de sobredispersión = 1.2) como modelo lineal generalizado. Se realizó un ANOVA de un factor y comparaciones múltiples a posteriori entre tratamientos con el método de Tukey.

Número de pausas: Se modeló con una distribución binomial negativa, como modelo lineal generalizado (link = log, factor de sobredispersión = 1.1). Se realizó una prueba de Wald y comparaciones múltiples a posteriori con el método de Tukey.

Todos los análisis se realizaron en R versión 3.6.2





Comportamiento de ingesta

Camponotus mus

Descripción de comportamientos particulares observados

Para los grupos de motivación Baja y Alta, se observaron comportamientos aversivos llamativos al momento de contactar las soluciones más concentradas de Bitrex, principalmente de B4 y B8. Cuando las hormigas se acercaban al cebo hacían un breve contacto antenal, retrocedían rápidamente y se limpiaban las antenas con las patas enfáticamente; o bien, se quedaban solamente un par de segundos en contacto con la solución y luego se retiraban, prácticamente, sin haber ingerido nada.

Gran cantidad de hormigas Moribundas presentaron comportamientos fuera de lo común, principalmente tiempos de ingesta excesivos (mayores a cinco minutos), donde las hormigas se “congelaban” en el cebo y no manifestaban movimientos antenales ni los asociados a la ingesta más allá del contacto de las mandíbulas con la gota (ej.: no movían antenas ni piezas bucales, no pausaban, no se desplazaban). En estos casos, en el recorrido de los puentes se observaban movimientos imprecisos y lentos en comparación con los sujetos experimentales de motivación Alta y Baja provenientes de nidos saludables. Estas observaciones –tiempos de ingesta mayores a 5 minutos- fueron descartadas para el análisis por no cumplir la metodología ya que no finalizaban la ingesta ni se dirigían hacia el puente de transferencia en un tiempo razonable acorde al experimento.

Peso inicial (P0)

Los pesos iniciales de las hormigas no difirieron entre tratamientos (ANOVA, p-valor = 0.36. Fig. 17, 1er panel - Anexo) pero sí entre motivaciones (ANOVA, p-valor = $146e^{-14}$. Fig.



17, 2do panel - Anexo). Esto último puede deberse a que se utilizó un n distinto entre motivaciones, lo cual produce desbalance. Las hormigas Moribundas resultaron tener una media significativamente mayor al resto y, asimismo, las hormigas de motivación Alta tuvieron una media significativamente mayor a las de motivación Baja. Este resultado impide comparar diferencias de peso entre motivaciones, por lo que se debió relativizar la variable de consumo de cebo como se explica en la sección de materiales y métodos. P0 promedio = 8.21 mg, P0 Motivación Baja = 6.56 mg, P0 Motivación Alta = 8.34 mg, P0 Moribundas = 10.14 mg.

Masa de cebo ingerida relativa

Las hormigas con motivación Baja consumieron solamente la solución control y el resto de las soluciones fueron rechazadas ampliamente en todas las concentraciones (masa ingerida relativa, medias por solución: B0 = 18.93, B1 = 5.06, B2 = 2.53, B4 = 0.14, B8 = 0.09. Masa media ingerida, en miligramos: B0 = 1.15, B1 = 0.24, B2 = 0.10, B4 = 0, B8 = 0) siendo significativa la diferencia entre el control y el resto de los tratamientos (p -valor < 0.00001 en todos los casos. Fig. 8, 1er panel).

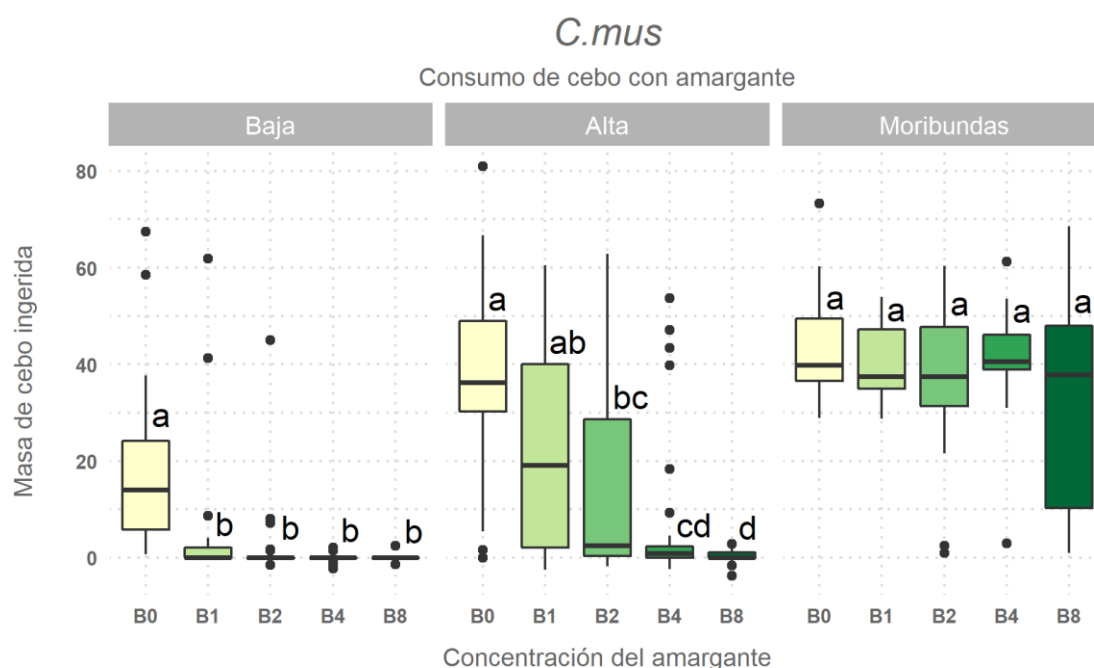


Fig. 8. Masa relativa de cebo azucarado adicionado con Bitrex, ingeridas por recolectoras de *C. mus*. La masa ingerida se mide como porcentaje de su peso inicial. Las concentraciones de Bitrex se muestran en orden creciente de B0 a B8 (verde claro – verde oscuro), siendo B0 el control (sin Bitrex).

Las hormigas provenían de nidos con distintos estados nutricionales: Baja, baja motivación por recolectar ($n = 25$ por tratamiento); Alta, alta motivación por recolectar ($n = 35$ por tratamiento); Moribundas, muy alta motivación para recolectar ($n = 19$ por tratamiento).

Línea horizontal negra de las cajas representa la mediana; el ancho de la caja, IQR; bigotes, mínimo y máximo (inferior y superior, respectivamente); puntos, datos atípicos (outliers).

Las hormigas con motivación Alta tuvieron un consumo de cebos decreciente con el aumento de la concentración de amargante adicionada, obteniendo rechazo prácticamente absoluto para B4 y B8 (masa ingerida relativa, medias por solución: B0 = 36.75, B1 = 22.55, B2 = 14.47, B4 = 6.79, B8 = 0.51. Masa media ingerida, en miligramos: B0 = 3.03, B1 = 1.69, B2 = 1.32, B4 = 0.42, B8 = 0.02). No se encontraron diferencias significativas entre B0 y B1, pero sí entre B0 y el resto de los tratamientos (p -valor < 0.01 en todos los casos. Fig. 8, 2do panel).

Las hormigas Moribundas consumieron todos los tratamientos indistintamente excepto B8, con el cual se observó gran cantidad de rechazos en comparación con el resto de los tratamientos (masa ingerida relativa, medias por solución: B0 = 43.69, B1 = 40.57, B2 = 36.44, B4 = 40.79, B8 = 32.02. Masa media ingerida, en miligramos: B0 = 4.44, B1 = 4.59, B2 = 3.36, B4 = 3.75, B8 = 2.86).

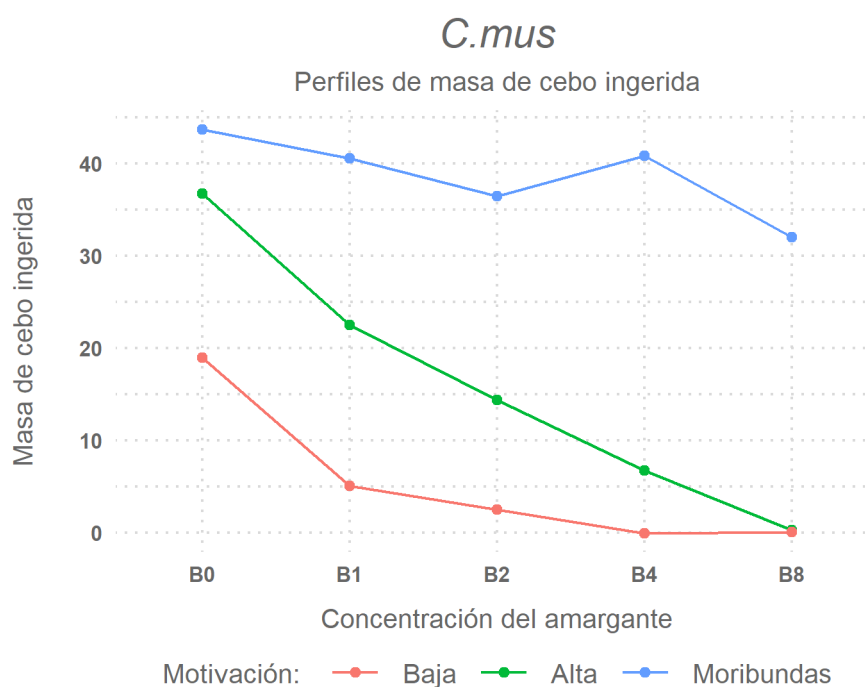


Fig. 9. Masa relativa de cebo azucarado adicionado con Bitrex, ingeridas por recolectoras de *C. mus*. La masa ingerida se mide como porcentaje de su peso inicial. Las concentraciones de Bitrex se muestran en orden creciente de B0 a B8, siendo B0 el control (sin Bitrex).

Las hormigas provenían de nidos con distintos estados nutricionales: Baja, baja motivación por recolectar ($n = 25$ por tratamiento); Alta, alta motivación por recolectar ($n = 35$ por tratamiento); Moribundas, muy alta motivación para recolectar ($n = 19$ por tratamiento).

Comparando entre los niveles de motivación, se observó, en términos descriptivos, que los individuos con motivaciones Baja y Alta presentan perfiles de comportamiento

similares, mientras que los individuos provenientes de nidos moribundos, presentan comportamientos disímiles (fig. 9). Asimismo, en líneas generales, se vio que, a mayor motivación, mayor consumo de cebo para todos los tratamientos, aunque se observan umbrales de tolerancia: a mayor motivación, más alto resulta el umbral de tolerancia (motivación Baja deja de consumir el cebo alrededor de B1, motivación Alta en B2-B4 y Moribundas recién empieza a caer en B8). Al comparar estadísticamente la ingesta de los controles de los tres estados motivacionales, resultaron todas significativas (p -valor < 0.01 en todos los casos).

Número de pausas

A modo de descripción, los grupos de Motivación Alta y Baja presentaron perfiles similares entre sí y, a su vez, diferentes con las Moribundas (fig. 10).

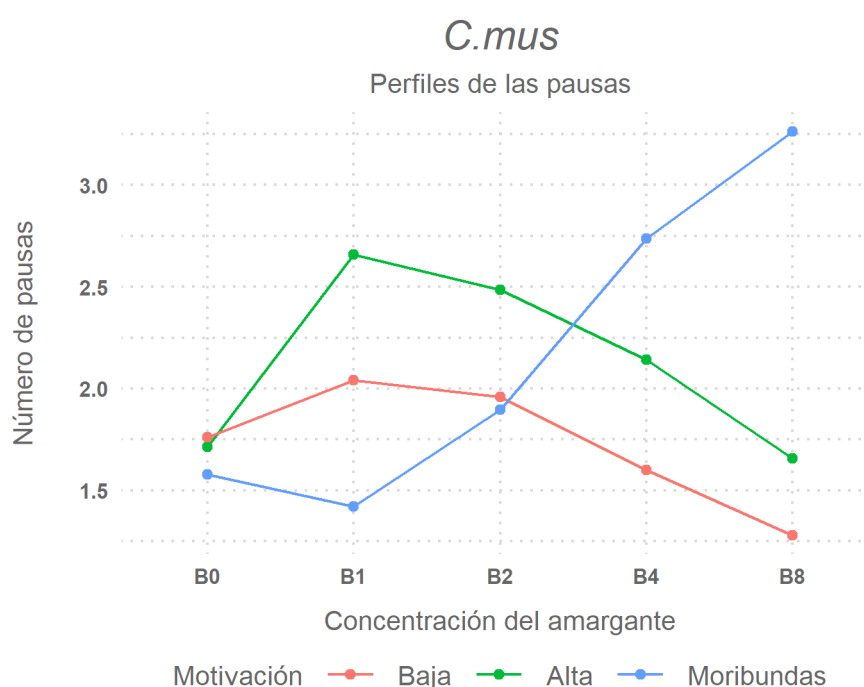


Fig. 10. Número de pausas durante la ingesta de cebo azucarado adicionado con Bitrex, ingeridas por recolectoras de *C. mus*. Las concentraciones de Bitrex se muestran en orden creciente de B0 a B8, siendo B0 el control (sin Bitrex).

Las hormigas provenían de nidos con distintos estados nutricionales: Baja, baja motivación por recolectar ($n = 25$ por tratamiento); Alta, alta motivación por recolectar ($n = 35$ por tratamiento); Moribundas, muy alta motivación para recolectar ($n = 19$ por tratamiento).

En líneas generales, el número de pausas en el control fue similar para cada grado de motivación (Valores medios: Baja = 1.76; Alta = 1.71; Moribundas = 1.57. Fig. 11). Sin embargo, para motivación Alta y Baja, comparando con el control, el número de pausas muestra una clara tendencia a subir en B1 y luego va bajando gradualmente hacia las mayores concentraciones de Bitrex. Por otro lado, para las Moribundas, de B1 a B8 el número de pausas crece monótonicamente. El número medio de pausas en B8 resultó en 1.28, 1.66 y 3.26 para motivación Baja, Alta y Moribundas, respectivamente.

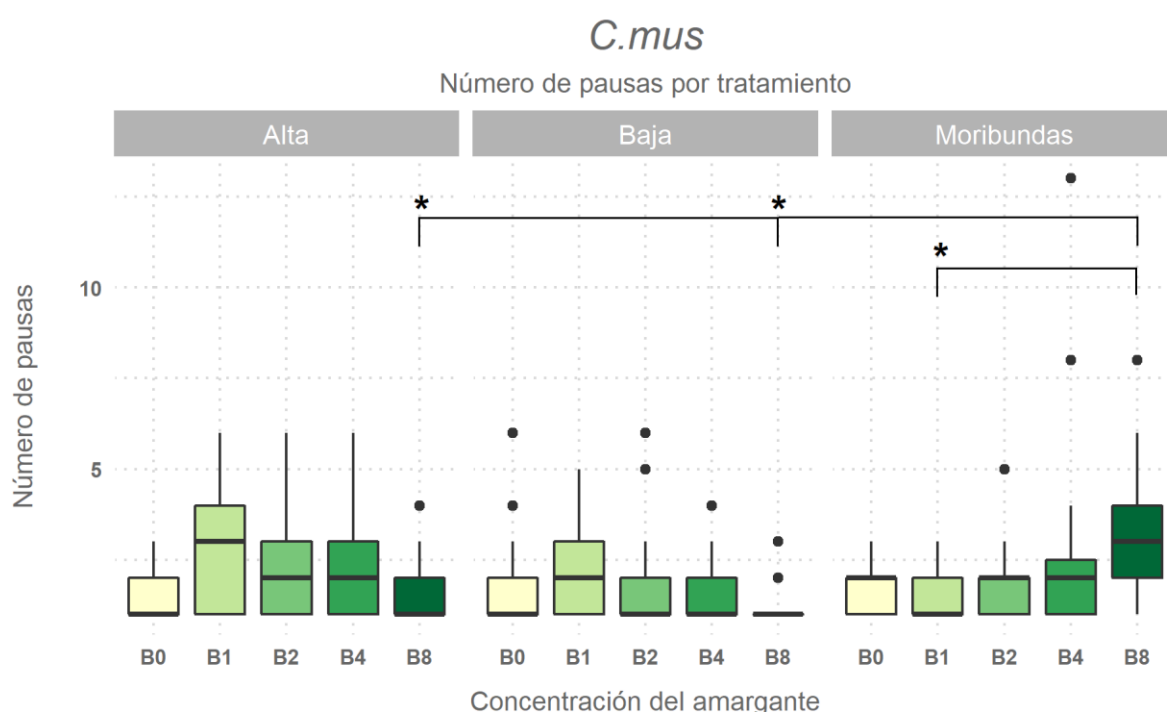


Fig. 11. Número de pausas durante la ingesta de cebo azucarado adicionado con Bitrex, ingeridas por recolectoras de *C. mus*. Las concentraciones de Bitrex se muestran en orden creciente de B0 a B8 (verde claro – verde oscuro), siendo B0 el control (sin Bitrex).

Las hormigas provenían de nidos con distintos estados nutricionales: Baja, baja motivación por recolectar (n = 25 por tratamiento); Alta, alta motivación por recolectar (n = 35 por tratamiento); Moribundas, muy alta motivación para recolectar (n = 19 por tratamiento).

Línea horizontal negra de las cajas representa la mediana; el ancho de la caja, IQR; bigotes, mínimo y máximo (inferior y superior, respectivamente); puntos, datos atípicos (outliers).

Medias por motivación y tratamiento:

Baja: B0 = 1.7; B1 = 2.0; B2 = 1.9; B4 = 1.6; B8 = 1.3. Alta: B0 = 1.7; B1 = 2.6; B2 = 2.5; B4 = 2.1; B8 = 1.7.

Moribundas: B0 = 1.6; B1 = 1.4; B2 = 1.9; B4 = 2.7; B8 = 3.3.

En términos estadísticos, las comparaciones múltiples resultaron significativas solamente entre los tratamientos B8 y B1 dentro de Moribundas y, también, entre B8 de

Moribundas contra B8 de motivación Alta y B8 de motivación Baja. El resto de las comparaciones resultaron no significativas (Fig. 11).

Tiempo de ingesta

El tiempo de ingesta en *C. mus* en este experimento correlacionó muy bien con la masa de cebo ingerida (Fig. 16 – Anexo) por lo cual es esperable el resultado obtenido (Fig. 12), muy similar al de masa relativa de cebo ingerida: mayores tiempos de ingesta con el control y concentraciones bajas de amargante comparado con el resto de los tratamientos en hormigas con motivación baja y alta. Asimismo, similares tiempos de ingesta entre tratamientos en hormigas moribundas.

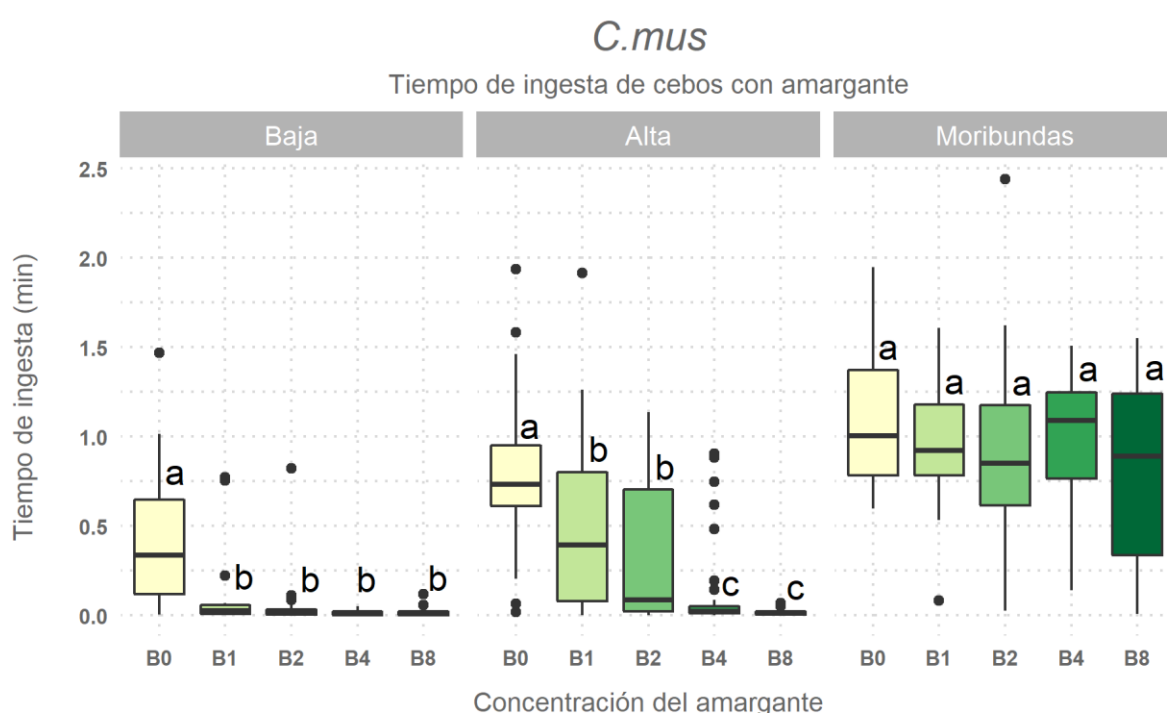


Fig. 12. Tiempo de ingesta (en minutos) de cebo azucarado adicionado con Bitrex, ingeridas por recolectoras de *C. mus*. Las concentraciones de Bitrex se muestran en orden creciente de B0 a B8 (verde claro – verde oscuro), siendo B0 el control (sin Bitrex).

Las hormigas provenían de nidos con distintos estados nutricionales: Baja, baja motivación por recolectar (n = 25 por tratamiento); Alta, alta motivación por recolectar (n = 35 por tratamiento); Moribundas, muy alta motivación para recolectar (n = 19 por tratamiento).

Línea horizontal negra de las cajas representa la mediana; el ancho de la caja, IQR; bigotes, mínimo y máximo (inferior y superior, respectivamente); puntos, datos atípicos (outliers).

Medias (en minutos) por motivación y tratamiento:

Baja: B0 = 0.43; B1 = 0.09; B2 = 0.06; B4 = 0.02; B8 = 0.02. Alta: B0 = 0.78; B1 = 0.50; B2 = 0.31; B4 = 0.13; B8 = 0.02. Moribundas: B0 = 1.12; B1 = 0.96; B2 = 0.96; B4 = 1.00; B8 = 0.83.



Entre grupos con distintas motivaciones, al igual que con la masa de cebo ingerida, se comparó estadísticamente solo entre los controles, encontrando, como era esperable, diferencias significativas entre las tres motivaciones (p -valor < 0.005 en todos los casos).

Linepithema humile

Descripción de comportamientos particulares observados

El comportamiento de ingesta de *L. humile* resultó mucho menos predecible y, por ende, su motivación más difícil de controlar que la de *C.mus*. En términos generales, se observó un comportamiento intermitente de ingesta - pausas para todas las concentraciones de amargante, presentando más variabilidad entre tratamientos tanto en la ingesta como el número de pausas comparado con *C.mus*.

Tiempo de ingesta

Las hormigas difirieron en los tiempos de ingestión dependiendo de la solución ofrecida (ANOVA, p -valor = 0.0058. Fig. 13). El grupo que ingirió la solución B8 difirió de todos los demás tratamientos excepto B2, con el cual las diferencias observadas no resultaron significativas, lo cual puede deberse a los datos atípicos de B8 (outliers). A su vez, entre control, B1, B2 y B4 no se obtuvieron diferencias significativas.

El tiempo de ingesta para el control presentó una media de 0.75 min (IC 95% = 0.53 - 0.98) mientras que B8 presentó una media de 0.30 min (IC 95% = 0.10 - 0.49).

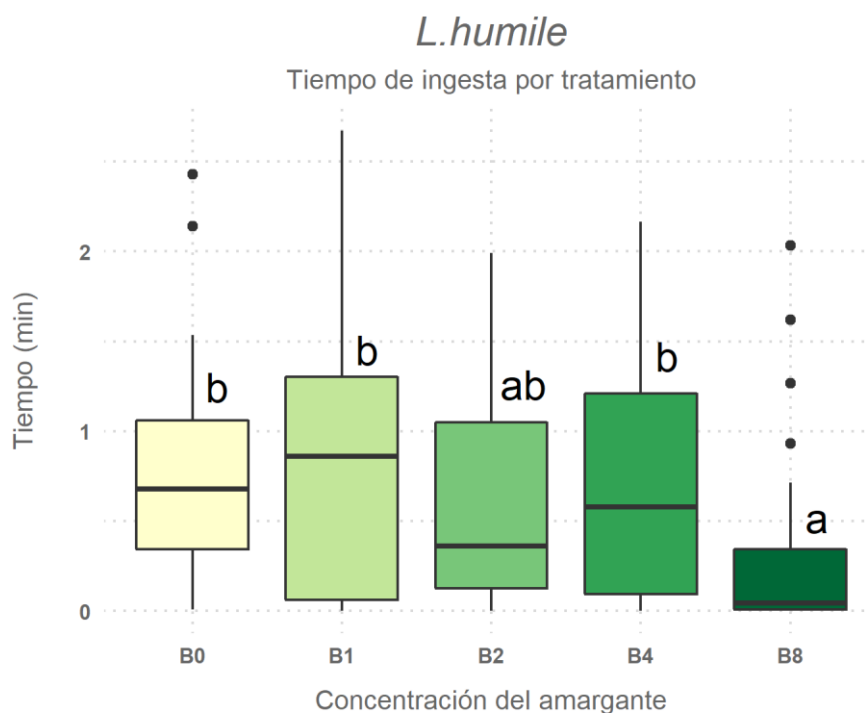


Fig. 13. Tiempo de ingesta (en minutos) de cebo azucarado adicionado con Bitrex, ingeridas por recolectoras de *L. humile*. Las concentraciones de Bitrex se muestran en orden creciente de B0 a B8 (verde claro – verde oscuro), siendo B0 el control (sin Bitrex). N = 30 por tratamiento.

Línea horizontal negra de las cajas representa la mediana; el ancho de la caja, IQR; bigotes, mínimo y máximo (inferior y superior, respectivamente); puntos, datos atípicos (outliers).

Número de pausas

Como muestra la Fig. 14, existen diferencias significativas entre el número de pausas en B8 y el control (Wald, p-valor < 0.001). Asimismo, no se encontraron diferencias entre el control y el resto de los tratamientos.

La media del número de pausas para el control es de 10.67 pausas (IC 95%, 6.67 - 14.67) mientras que para B8 es de 3.97 (IC 95%, 2.40 - 5.53).

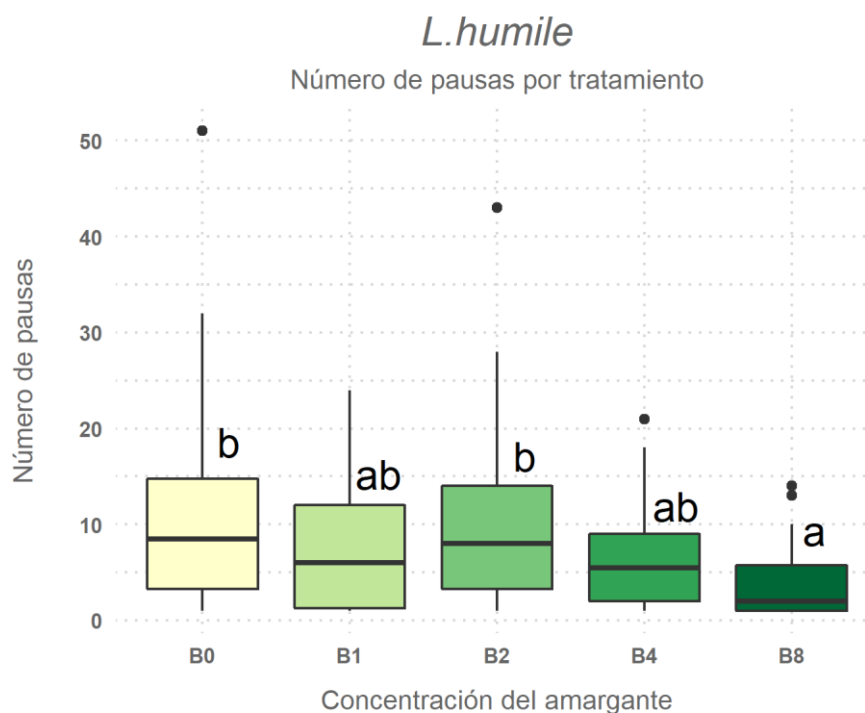


Fig. 14. Número de pausas durante la ingesta de cebo azucarado adicionado con Bitrex, ingeridas por recolectoras de *L. humile*. Las concentraciones de Bitrex se muestran en orden creciente de B0 a B8 (verde claro – verde oscuro), siendo B0 el control (sin Bitrex). n = 30 por tratamiento. Línea horizontal negra de las cajas representa la mediana; el ancho de la caja, IQR; bigotes, mínimo y máximo (inferior y superior, respectivamente); puntos, datos atípicos (outliers).

Sobrevida

Tanto para *C. mus* como *L. humile*, se comparó la mortalidad entre los grupos de hormigas que consumieron distintas concentraciones de Bitrex. No hubo diferencias entre grupos, de hecho, prácticamente no hubo mortalidad para ninguna de las dos especies.

En la totalidad del tiempo medido (15 días post ingestión) se registró 1 muerte en el grupo control y 1 pérdida (escape del individuo) en el tratamiento B1, ambos de *C. mus*, motivación Alta.



Discusión

Interpretación de los resultados obtenidos

Las hormigas de la especie *C. mus* pueden percibir el Bitrex, mostrando una respuesta de rechazo dosis dependiente: a mayor concentración, mayor rechazo. Este rechazo se ve fuertemente modulado por la motivación del animal. En un extremo, hormigas con una baja motivación por recolectar presentan gran rechazo aun para mínimas concentraciones de Bitrex. En el otro extremo, hormigas con una muy alta motivación por recolectar aceptan todas las soluciones ingiriendo, incluso, gran cantidad de solución con alta concentración de Bitrex.

Si bien se encontró un continuo en la respuesta de ingestión, es decir, a mayor motivación, menos rechazo, las hormigas Moribundas presentaron perfiles de ingesta y número de pausas disímiles con respecto a las hormigas con motivación Baja y Alta (figs. 9 y 11). Además, se observaron comportamientos distintos en términos descriptivos (movimientos atípicos presentes en la mayoría de los individuos y, a veces, el congelamiento mencionado en resultados). Estos comportamientos pueden deberse a la mala alimentación de estos individuos, lo cual puede haberlos conducido a padecer problemas fisiológicos y respuestas aletargadas. Encontrar nidos en estado moribundo, probablemente, no es una situación normal en la naturaleza, por lo cual estas respuestas no serían la norma si quisiéramos extrapolar estos resultados a campo. La relevancia de la respuesta de las moribundas es entender que existe un grado de motivación (aunque extremo) en el cual los individuos de un nido aceptan (casi) cualquier concentración de amargante –del rango trabajado- en los cebos azucarados, en comparación con otros estados de motivación en los cuales la aceptación es nula, casi nula, o se modula gradualmente disminuyendo con respecto al control.

Los valores obtenidos de masa de cebo ingerida en Moribundas corresponderían a la carga máxima para estas hormigas -siempre refiriéndonos a “carga relativa”, ya que la carga aumenta con el tamaño de la hormiga-, tanto en esta especie (Josens, 2002), como entre especies de hormigas nectívoras (Davidson et al., 2004). Así, podríamos decir que la carga máxima del buche resulta entre un 40 y 50 % del peso de la hormiga vacía, en ocasiones

puede llegar a superar el 60%. Estos valores medios son similares a lo descrito para esta especie ingiriendo una solución de sacarosa 30%. (Josens et al., 1998). También los tiempos de ingestión coincidieron con el mencionado trabajo, ya que fueron de aproximadamente 1 minuto.

Resulta llamativa la coincidencia mencionada en la carga relativa puesto que, para las hormigas Moribundas, la motivación por ingerir fue extremadamente alta, mientras que, para las hormigas del estudio mencionado (Josens et al., 1998), no lo era. Otro trabajo posterior (Josens y Roces, 2000) mostró que la carga del buche dependía de las restricciones de carbohidratos en la colonia, llevando de un 25% a un 40% la carga relativa del buche con una solución de sacarosa al 10%. En nuestro estudio, las hormigas control ingirieron, en promedio, un 19% de su peso con baja motivación, llegando a 36% al estar altamente motivadas, con valores extremos que alcanzaron el 80%. Por estas razones, una vez más, podemos ratificar que la carga relativa se modula por motivación. Por otro lado, un factor que podría introducir un margen de variabilidad al comparar trabajos diferentes es la forma de expresar la solución ingerida, la cual puede ser en masa o en volumen. Es probable que el límite para la solución ingerida sea dado por el volumen máximo del buche, es decir, por su máxima capacidad de distensión; aunque, en general, por ser soluciones en base de agua y solo con sacarosa, las desviaciones de la densidad del agua no son muy grandes y se van ampliando con la concentración. Dado que trabajamos con soluciones poco concentradas, dicha diferencia podría considerarse despreciable.

En términos descriptivos, se observó que el número de pausas en *C.mus* era bajo en el control, lo cual podría significar que las hormigas comen el cebo sin interrupciones ya que no tienen una percepción negativa del alimento. En los casos en que se vio mayor número de pausas fue en concentraciones de amargante bajas y motivación Alta, donde pareciera que las hormigas comen el cebo debido a su gran necesidad dados los días de ayuno que las motivan, pero manifiestan el rechazo hacia el cebo amargo con sucesivas pausas, pudiendo dar un indicio de que “lo comen, pero no les gusta”. Finalmente, en los casos en que el rechazo fue total (ingesta nula, limpieza de antenas, indiferencia inmediata y retorno inmediato hacia el puente de transferencia), el número de pausas fue bajo dado que tampoco hubo consumo del cebo.

Siguiendo la misma lógica, las hormigas con motivación Baja tuvieron bajo o nulo número de pausas porque la masa de cebo ingerida también fue nula o baja para casi cualquier tratamiento, es decir “no pausaron porque no comieron”. En hormigas con motivación Alta, el número de pausas aumenta solo en los tratamientos con concentraciones bajas de amargante, lo cual se podría interpretar como “hacen pausas porque no les gusta, pero lo siguen comiendo porque tienen hambre”. En el caso de las Moribundas, podría

sucedir que sus altas necesidades alimenticias las lleven a aceptar casi cualquier solución; sin embargo, al quedarse suficiente tiempo e ingerir suficiente carga, pareciera que esto da lugar a un gran número de pausas que aumentan con la concentración de Bitrex, lo cual indica que, a pesar de que lo aceptan y lo ingieren, perciben la presencia del amargante y este tiene un efecto disuasor de la ingestión. Nuevamente, las hormigas con esta motivación son, quizás, excepcionales y estos resultados deberían ser tomados con cautela dados los comportamientos atípicos que se observaron.

Es relevante tener en cuenta el número de comparaciones que se hicieron lo cual baja ampliamente la potencia del test estadístico y, asimismo, el número de individuos por tratamiento con el que se trabajó. Sería interesante poder repetir el experimento con más individuos por tratamiento y más nidos, para tener resultados más robustos principalmente en los nidos con hormigas moribundas.

Debido a las particularidades del comportamiento de ingesta de *L.humile*, las diferencias observadas no resultaron tan contundentes como en *C.mus*. *L.humile* presentó una motivación muy alta debido a la alta concentración del cebo ofrecido. Pese a ello, se demostró que existe una variación en el comportamiento de ingesta de *L.humile* provocada por la adición de Bitrex en una alta concentración a los cebos azucarados. La modulación por motivación se discute más adelante en esta sección.

Finalmente, el hecho de no observar mortalidad diferencial entre tratamientos para cualquier motivación era esperado. Este resultado es razonable entendiendo que la adición del amargante no tiene por finalidad la muerte de los individuos sino el simple hecho de ser repulsivo para el hombre. Pese a ello, es importante demostrarlo, puesto que, por ejemplo, en abejas se vio que el consumo de determinadas sustancias aversivas puede inducir un estado de malestar post-ingestión que, en algunos casos, resulta en la muerte (Ayestaran et al., 2010). Sin embargo, el Bitrex no resulta tóxico para las dos especies de hormiga con las que se trabajó en el rango de 10 a 80 ppm.

Percepción del amargo

Se ha demostrado la percepción del sabor amargo en diferentes insectos, sin embargo, hasta el presente, no se cuentan con estudios realizados en hormigas. Existen trabajos donde se utiliza quinina como estímulo aversivo en ensayos de aprendizaje de olores (Josens et al., 2009; Guerrieri y d'Ettorre, 2010; Dupuy et al., 2006, d'Ettorre et al. 2017) suponiendo que la quinina funciona como tal, siguiendo protocolos basados en la respuesta

comportamental de abejas (Chittka et al. 2003; Dyer and Chittka 2004a, 2004b). Para el estudio del aprendizaje olfativo durante la recolección en hormigas (Dupuy et al., 2006), se utilizó un laberinto en Y utilizando dos olores, uno en cada brazo. Mientras que un olor era siempre presentado junto con una recompensa (azúcar), el otro se presentaba siempre con quinina (suponiéndolo un estímulo aversivo). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que la quinina no resultó ser un estímulo que generara una memoria aversiva y/o un comportamiento de evitación. Hormigas ya entrenadas a las cuales se les había presentado la quinina como estímulo aversivo, se las sometió a un nuevo ensayo donde se le dio a elegir entre el olor presentado previamente junto a quinina o un olor nuevo: las hormigas eligieron el olor asociado a quinina (Josens et al., 2009). Si la quinina hubiese actuado como un estímulo aversivo y hubiese generado una memoria aversiva, las hormigas habrían elegido el olor desconocido, evitando el olor asociado a la quinina. En abejas, se sugirió que las memorias aversivas que se establecen con estos compuestos serían por el malestar posterior que generan y no por la detección quimiosensorial (Ayestarán et al., 2010).

Los ensayos realizados en hormigas, hasta el momento, no brindaron ninguna evidencia sobre la quimiorrecepción de lo amargo; por lo cual -hasta donde sabemos- el presente trabajo muestra, por primera vez, evidencia concluyente de que las hormigas detectan un compuesto amargo al presentarse en solución azucarada y tienen la sensibilidad de discernir entre distintas concentraciones. El benzoato de denatonio, entonces, resultó una sustancia amarga disuasoria de la ingesta, la primera hasta ahora evaluada en ensayos de percepción en hormigas.

En general, mamíferos e insectos manifiestan un comportamiento aversivo hacia el sabor amargo. Evolutivamente, esta respuesta se pudo haber adquirido pudiendo ser el sabor amargo un indicador de toxinas vegetales. El contacto con sustancias amargas venenosas diferentes formó un repertorio de receptores de sabor amargo exclusivo de cada especie para servir como sensores de advertencia contra la ingestión de compuestos alimenticios tóxicos (Behrens y Meyerhof, 2009).

Resulta llamativa la gran cantidad de genes de receptores gustativos y olfativos que tienen algunas especies de hormigas en comparación a la cantidad de genes de receptores que presentan las abejas (Xu et al., 2016). En algunas especies de hormigas se han observado subfamilias de genes expandidas con respecto a *Apis mellifera* y se hipotetiza que esta pérdida en las abejas (o expansión en las hormigas) incluye receptores de sabor amargo; es decir, las abejas podrían haber perdido la funcionalidad de los receptores de sabor amargo en la transición a la alimentación nectívora, mientras que esta percepción resulta fundamental en ciertas especies de hormigas para evitar la ingestión de semillas y sustancias vegetales tóxicas (Smith CR et al., 2011; Smith CD et al., 2011). Esto, sumado a los comportamientos

descriptos en la presente tesis, suma evidencia de que, en hormigas, al igual que en otras especies de animales, el amargo también podría servir como sensor de advertencia contra la ingestión de compuestos alimenticios tóxicos.

Observaciones personales realizadas durante el presente estudio en ambas especies de hormiga con las que se trabajó revelaron comportamientos aversivos recién con el contacto con el cebo azucarado adicionado con amargante y no durante el trayecto de la hormiga hacia el cebo, el cual en la mayoría de los casos fue directo, aun cuando los puentes utilizados eran nuevos y no había feromona marcando el camino. Esto sugiere que la detección de la solución –o su identificación como sustancia aversiva- es por contacto y no por olfacción. La quimiorrecepción de contacto de compuestos amargos se ha descrito de distintas formas en otros insectos, pudiendo ser por células gustativas sensibles a sustancias amargas como ocurre en moscas (Marella et al., 2006) o interferencia de la sustancia amarga con la dulce, como ocurre en abejas, otro himenóptero (De Brito Sanchez, 2011). A continuación, se describirán brevemente los mecanismos fisiológicos de la quimiorrecepción de sabores amargos en abejas, moscas y otros taxones, con la finalidad de tener un marco comparativo con los modelos más cercanos a las hormigas disponibles hasta el momento, para luego generar una hipótesis acerca del posible mecanismo de detección empleado por las especies de hormiga del presente trabajo.

Las abejas poseen sensilias chaeticas y/o basicónicas en las antenas, piezas bucales y segmentos distales de las patas delanteras, las que se activan con soluciones de sacarosa y se inhiben con mezclas de sacarosa y quinina, pero no se activan al ser estimuladas solamente con quinina (de Brito Sanchez et al., 2005). Esto tiene su correlato comportamental, ya que abejas que extienden su proboscide al ser estimuladas con solución de sacarosa, no lo hacen si esta contiene también quinina (de Brito Sanchez et al., 2005) y esto no ocurre con otros compuestos amargos; por lo cual, se entiende que, claramente, la quinina adicionada a una solución de sacarosa inhibe la neurona receptora de sacarosa.

Por otro lado, en moscas se han observado neuronas receptoras del gusto en las labella (piezas bucales), en los tarsos de las patas y en el margen de las alas (Yarmolinsky et al., 2009). Al igual que en el gusto de los mamíferos, la expresión del receptor en las moscas también define poblaciones estrictamente segregadas de neuronas receptoras del gusto (Yarmolinsky et al., 2009) y se ha identificado una neurona motora dentro del ganglio subesofágico que parece actuar como integradora de entradas amargas y dulces para controlar la extensión de la trompa (Gordon y Scott, 2009). Esta neurona es inhibida por actividad de “neuronas receptoras de amargo” y activada por “neuronas receptoras de dulce”. Así, las líneas marcadas “amargo” y “dulce” finalmente se unen para coreografiar las



respuestas antagónicas en las neuronas que controlan el comportamiento de alimentación (Yarmolinsky et al., 2009).

En mamíferos, los aproximadamente 30 genes que codifican receptores de sabor amargo no solo conducen a la variabilidad de la percepción del sabor amargo entre las especies, sino que también muestran un grado considerable de variabilidad intraespecie, tal como se observa en ratones (Boughter et al. 2005) y humanos (Bartoshuk 2000; Bufe et al. 2005; Kim et al. 2003, 2005, Pronin et al. 2007; Soranzo et al. 2005; Wooding et al. 2004). En insectos es diversa la cantidad de genes que codifican receptores gustativos (Gr, por las siglas en inglés). En *Drosophila melanogaster* hay unos 68 genes que codifican unos 60 Grs (Robertson et al., 2003), mientras que en la abeja melífera hay solo 10 genes y cada uno codifica un receptor (Robertson y Wanner, 2006). En hormigas se vio que la cantidad de genes que codifican Grs varía según la especie; algunas tienen pocos, por ejemplo, en *Camponotus floridanus* se encontraron 11 Grs; en *Harpegnathos saltator*, 6 Grs (Bonasio et al., 2010). Otras, por el contrario, presentan mayor cantidad de genes codificando Grs: *Pogonomyrmex barbatus* posee 73 genes (Smith et al., 2011a), y en *L. humile* se han encontrado 116 Grs (Smith et al., 2011b).

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, hipotetizamos que la detección del Bitrex es directa, es decir, existirían receptores específicos que dispararían una respuesta al estar presente esta sustancia. Las bajas concentraciones utilizadas y el aumento en el número de pausas que incrementan junto con la concentración de amargante dan indicios de detección directa de un compuesto disuasorio durante la ingesta. A su vez, estimamos que podrían estar involucrados Grs -a pesar de que en una especie del mismo género que *C.mus*, *C.floridanus*, ninguno de los genes codificadores de Grs correspondería a detección de amargos (Bonasio et al., 2010, material suplementario)- o, quizás receptores inotrópicos (IRs - proteínas canal), dado que, si bien no se conocen IRs para amargos, no podríamos descartarlos ya que el Bitrex es una sal orgánica y, en *Drosophila*, los IRs se abren con moléculas pequeñas y polares como algunas sales. Se deberían realizar ensayos de detección por sensilia única para poner a prueba estas hipótesis.

Modulación por motivación

En abejas, la sensibilidad -alta o baja- con respecto a los compuestos aversivos puede depender no solo de los recursos que están disponibles para las abejas recolectoras, como lo demuestran los experimentos de campo (de Brito Sanchez, 2011), sino también del contexto experimental específico utilizado para preguntarle a la abeja sobre sus capacidades gustativas (de Brito Sanchez, 2011). Por ejemplo, aunque las abejas que vuelan libremente

rechazan las soluciones de sacarosa con altas concentraciones de sustancias amargas en el campo, este rechazo no se manifiesta cuando las abejas son manipuladas en el laboratorio con arneses y se les presentan diferentes tipos de sustancias amargas. El mismo razonamiento de la motivación puede explicar estos resultados. Una abeja capturada y sujeta en un arnés requiere alimento y no tiene opciones para elegir; mientras que una abeja en vuelo cuenta con toda la flora melífera para visitar, no tiene una motivación tan alta y rechaza soluciones de sacarosa con amargante. En suma, en abejas, la adición de amargante puede interferir con la percepción de la sacarosa o, al menos, afectar su respuesta, la cual varía dependiendo de las condiciones en las que está el insecto (de Brito Sanchez, 2011). Esta dualidad -o contradicción- en las condiciones suele ser frecuente: ensayos a campo sin ningún control de la disponibilidad de alimento al que accede la colonia o ensayos de laboratorio en condiciones irreales. Considerar esto es fundamental a la hora de fabricar cebos para el control de hormigas, ya que muchos compuestos y formulados evaluados en laboratorio pueden mostrar un desempeño exitoso y luego pueden no funcionar a campo.

Tal como es la tradición del grupo de investigación, los experimentos para esta tesis se han hecho en situación controlada, pero de libre actividad. Esto es, el trabajo ha sido realizado exclusivamente bajo condiciones de laboratorio, pero recreando, para el individuo experimental, una situación de recolección. De este modo el individuo camina, explora, encuentra una fuente de alimento y decide si ingerir o no, cuánto ingerir, hacer pausas, cuándo finalizar la ingesta; todo de forma imperturbable.

Teniendo en cuenta los resultados observados en abejas, si bien nuestros experimentos no requieren una manipulación tan restrictiva como la colocación de arneses, sería apropiada la realización de un trabajo similar a este en condiciones de campo para estudiar variaciones en la ingesta de amargante debido, no solo a las condiciones experimentales, sino también a la disponibilidad de recursos en su ambiente natural. En este trabajo, para lograr llegar a la saturación de la respuesta de aceptación, se tuvo que llevar a las hormigas a un estado extremo. Quizás, en campo se encuentra que las hormigas aceptan menos –o, tal vez, más - el Bitrex sin necesidad de encontrarse en ese estado de baja movilidad y aletargamiento que mostraban las moribundas.

Al ser la alimentación un sistema motivacional en animales, tenemos que pensar a la hormiga en términos de la colonia. Las hormigas, como insectos eusociales, responden a las necesidades de la colonia como una unidad: mientras la colonia tenga necesidad de hidratos de carbono, la obrera estará motivada a recolectar. Esta modulación de la respuesta ha sido mostrada en distintas oportunidades en hormigas (Falibene et al., 2009; Falibene and Josens, 2008; Josens and Roces, 2000). Asimismo, también el individuo puede estar motivado por su necesidad nutricional, tal es el caso de la ocurrencia de “licking” (movimiento de extensión y



retracción de la glosa) que ocurre en respuesta al contacto con azúcar (Falibene y Josens, 2012).

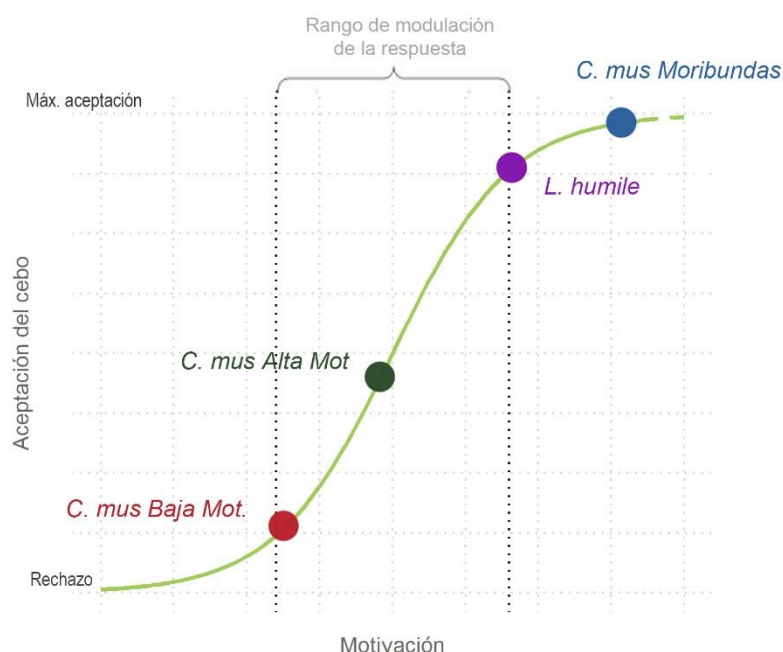


Fig. 15. Curvas de motivación hipotéticas para las dos especies de hormiga con las que se trabajó. El *rango de modulación de la respuesta* es aquel intervalo en la motivación que no resulta en una aceptación o rechazo absoluto del cebo. El eje X hace referencia a la motivación por obtener un determinado recurso. En base a los resultados obtenidos, se ubicó a los cuatro grupos con los que se trabajó en esta curva hipotética. *C. mus Baja* y *L. humile* se encuentran en los extremos -inferior y superior, respectivamente- del rango de modulación de la respuesta. *C. mus Alta* en el medio (mayor variabilidad en la respuesta) y *C. mus Moribundas* en la zona de saturación, en la máxima aceptación.

Nuestros resultados muestran que la aceptación de cebos azucarados con benzoato de denatonio también se modula por motivación, en nuestro caso, variando los días de ayuno de los nidos de *C. mus*. En *L. humile* no se estudió la modulación de ingesta para diferentes situaciones motivacionales como para lograr observar estos cambios, ya que en esta especie es muy difícil caracterizar distintos estados motivacionales a través de la dieta administrada a los nidos. La modulación de la ingesta del cebo en *L. humile* se vio únicamente con la disminución de la concentración de azúcar en los ensayos de puesta a punto (30% en *C. mus* vs 5% en *L. humile*) como se tenía registro en trabajos anteriores (Sola y Josens, 2016), pero no con los días de ayuno del nido. Esto podría indicar que el rango de modulación de la respuesta de *L. humile*, mediante la dieta suministrada a la colonia, es mucho más acotado que el de *C. mus*. Deberían realizarse los mismos ensayos con amargante en cebos con 5% de sacarosa en lugar de 30% para visualizar variaciones en la respuesta.

Como se muestra en la Fig. 15, teniendo en cuenta la aceptación del cebo azucarado 30% con distintas concentraciones de Bitrex, podemos ubicar las distintas respuestas de las hormigas con las que se trabajó: *C.mus* con motivación Baja se encuentra en el límite del rango de modulación, es decir, ese grupo experimental tuvo poca variación mostrando bajo consumo de cebo. Opuestamente, *L.humile* también se halló en el límite del rango de modulación, ya que presentó poca variabilidad en la respuesta, pero mostrando alto consumo de cebo. *C.mus* Alta fue el grupo con mayor variabilidad, en el que se pudo observar con mayor precisión la modulación ante las distintas concentraciones de Bitrex. Por último, *C.mus* Moribundas fue el grupo con menor variabilidad, ubicándose en la meseta superior de la curva de motivación, mostrando una saturación en la respuesta de máxima aceptación del cebo.

Formulación de cebos comerciales

En términos de la formulación de cebos comerciales, es importante el compromiso entre la aversión que tienen que causar a los humanos y la no aversión que tienen que causar a las hormigas. En este sentido, el benzoato de denatonio resulta “un arma de doble filo”, puesto que los rangos de concentraciones que causan el rechazo en humanos y en hormigas se superponen. Teniendo en cuenta que la motivación es un factor crucial para la toma de decisión en la ingesta, es importante destacar que la muy alta aceptación de concentraciones de amargante que mostraron las hormigas moribundas, en campo resulta el escenario ideal para aplicar un cebo, pero –presuntamente- no es el más probable. No obstante, Faehl, 2001 encontró una gran aceptación de una concentración mayor al máximo utilizado en este trabajo (100 ppm vs. 80 ppm) en situación de campo para una especie del mismo género de la que aquí se trabajó. Esta diferencia puede deberse a una gran motivación por parte de las hormigas con las que se realizó ese trabajo, a una diferencia motivacional debido al contexto (laboratorio vs campo) o a que se tratan de especies distintas que podrían llegar a tener diferente percepción y respuesta a los amargantes. Distintas especies de hormiga pueden responder en forma opuesta a la presencia de sustancias tóxicas: mientras que unas especies pueden rechazar determinado compuesto, otras pueden aceptar ese y rechazar otras sustancias (Sola et al., 2013). Considerando esto y los resultados obtenidos en el presente trabajo, entendemos que es clave tener en cuenta a la especie blanco. Mientras que para *L. humile* se puede pensar en un cebo con alto contenido de Bitrex (de 10 a 40 ppm) en la medida que esté acompañado de un alto contenido de azúcar; no recomendaríamos lo mismo para *C. mus*. Para hormigas carpinteras sería conveniente minimizar la cantidad de Bitrex, y, para evitar ingestiones accidentales, tal vez, aumentar la seguridad mediante los envases, o mediante la forma o lugar de colocación.

Ante la falta de más evidencia en otras especies y en base a nuestros datos, para cebos tóxicos que se comercialicen como hormiguicidas de amplio espectro, se recomienda minimizar al máximo posible el uso de Bitrex intentando que sea una concentración que asegure la aversión humana. Se deberían realizar más estudios con otras especies de hormiga tanto en situación de campo como laboratorio para tener un panorama más amplio de cómo el Bitrex modula la ingesta de estos animales.



Conclusiones



- Las hormigas perciben la presencia del Bitrex en soluciones de sacarosa.
- El Bitrex es disuasor de la ingestión.
- Su efecto es dosis dependiente: a mayor concentración, mayor rechazo.
- La respuesta de rechazo se modula por motivación, cuanto más alimento alternativo disponga una colonia más rechazará el cebo con Bitrex.
- La detección y el efecto disuasor es similar tanto en *C.mus* como en *L.humile*.
- El Birex no afecta la sobrevivencia de las hormigas, resulta una sustancia no nociva tanto para *C.mus* como para *L.humile*.





Este trabajo aporta datos novedosos acerca de la percepción del sabor amargo en hormigas.

El haber demostrado que el Bitrex es disuasor de la ingestión y teniendo en cuenta el masivo recibimiento del Bitrex en los cebos comerciales y su gran uso actual, resulta necesario seguir desarrollando trabajos que den a conocer las respuestas comportamentales de ingesta en respuesta al Bitrex, tanto en laboratorio como en campo y con diferentes especies de hormiga, dado que, como mostramos en el presente trabajo, hay una gran variabilidad en la modulación de la respuesta de ingesta según la especie con la que se trabaje. La optimización de la eficiencia de los cebos comerciales implica el necesario desarrollo de estos conocimientos.

Por otro lado, si bien el trabajo no tuvo un enfoque fisiológico, dado la escasa información que existe sobre la percepción del sabor amargo en hormigas, resulta un buen punto de partida para abordar el tema desde una perspectiva fisiológica y comportamental.





Bibliografía

Arnold Jr, C. L., y Gibbons, C. J. (1996). Impervious surface coverage: the emergence of a key environmental indicator. *Journal of the American planning Association*, 62(2), 243-258.

Ayestaran A, Giurfa M, de Brito Sanchez MG (2010) Toxic but drank: gustatory aversive compounds induce post-ingestional malaise in harnessed honeybees. *PLoS One* 5(10).

Baker, H. G., Opler, P. A., y Baker, I. (1978). A comparison of the amino acid complements of floral and extrafloral nectars. *Botanical Gazette*, 139(3), 322-332.

Bartoshuk, L. M. (2000). Comparing sensory experiences across individuals: recent psychophysical advances illuminate genetic variation in taste perception. *Chemical senses*, 25(4), 447-460.

Beatson, S. (1972). Pharaoh's ants as pathogen vectors in hospitals. *The Lancet*, 299(7747), 425-427.

Behrens, M., y Meyerhof, W. (2009). Mammalian bitter taste perception. In *Chemosensory Systems in Mammals, Fishes, and Insects* (pp. 77-96). Springer, Berlin, Heidelberg.

Berning, C. K., Griffith, J. F., y Wild, J. E. (1982). Research on the effectiveness of denatonium benzoate as a deterrent to liquid detergent ingestion by children. *Toxicological Sciences*, 2(1), 44-48.

BLÜTHGEN, N., Gottsberger, G., y Fiedler, K. (2004). Sugar and amino acid composition of ant-attended nectar and honeydew sources from an Australian rainforest. *Austral Ecology*, 29(4), 418-429.

Bonasio, R., Zhang, G., Ye, C., Mutti, N. S., Fang, X., Qin, N., ... y Zhang, P. (2010). Genomic comparison of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. *science*, 329(5995), 1068-1071.



Boughter, J. D., Raghoebar, S., Nelson, T. M., y Munger, S. D. (2005). Inbred mouse strains C57BL/6J and DBA/2J vary in sensitivity to a subset of bitter stimuli. *BMC genetics*, 6(1), 36.

Boulay, R., Soroker, V., Godzinska, E. J., Hefetz, A., y Lenoir, A. (2000). Octopamine reverses the isolation-induced increase in trophallaxis in the carpenter ant *Camponotus fellah*. *Journal of Experimental Biology*, 203(3), 513-520.

Bueno, O. C., y Campos-Farinha, A. D. C. (1999). As formigas domésticas. Insetos e outros invasores de residências. *Piracicaba: FEALQ*, 135-180.

Bufe, B., Breslin, P. A., Kuhn, C., Reed, D. R., Tharp, C. D., Slack, J. P., ... y Meyerhof, W. (2005). The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception. *Current Biology*, 15(4), 322-327.

Camazine, S. (1993). The regulation of pollen foraging by honey bees: how foragers assess the colony's need for pollen. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 32(4), 265-272.

Cassill, D. (2003). Rules of supply and demand regulate recruitment to food in an ant society. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 54(5), 441-450.

Cassill, D. L., y Tschinkel, W. R. (1995). Allocation of liquid food to larvae via trophallaxis in colonies of the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Animal Behaviour*, 50(3), 801-813.

Chapman, A. D. (2009). Numbers of living species in Australia and the world.

Chittka, L., Dyer, A. G., Bock, F., y Dornhaus, A. (2003). Bees trade off foraging speed for accuracy. *Nature*, 424(6947), 388-388.

Cole, F. R., Medeiros, A. C., Loope, L. L., y Zuehlke, W. W. (1992). Effects of the Argentine ant on arthropod fauna of Hawaiian high-elevation shrubland. *Ecology*, 73(4), 1313-1322.

d'Ettorre, P., Carere, C., Demora, L., Le Quinquis, P., Signorotti, L., y Bovet, D. (2017). Individual differences in exploratory activity relate to cognitive judgement bias in carpenter ants. *Behavioural processes*, 134, 63-69.

Davidson, D. W. (1997). The role of resource imbalances in the evolutionary ecology of tropical arboreal ants. *Biological Journal of the Linnean Society*, 61(2), 153-181.



De Brito Sanchez MG, Giurfa M, Mota TRD, Gauthier M (2005). Electrophysiological and behavioural characterization of gustatory responses to antennal 'bitter' taste in honeybees. *Eur J Neurosci* 22(12):3161–3170).

De Brito Sanchez, M. G. (2011). Taste perception in honey bees. *Chemical senses*, 36(8), 675-692.

Dent, D. (2000). Insect pest management. Cabi.

Dunn, O. J. (1964). Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics*, 6(3), 241-252.

Dupuy, F., Sandoz, J. C., Giurfa, M., y Josens, R. (2006). Individual olfactory learning in *Camponotus* ants. *Animal Behaviour*, 72(5), 1081-1091.

Dussutour, A., y Simpson, S. J. (2008). Carbohydrate regulation in relation to colony growth in ants. *Journal of Experimental biology*, 211(14), 2224-2232.

Dyer, A. G., y Chittka, L. (2004a). Biological significance of distinguishing between similar colours in spectrally variable illumination: bumblebees (*Bombus terrestris*) as a case study. *Journal of Comparative Physiology A*, 190(2), 105-114.

Dyer, A. G., y Chittka, L. (2004b). Fine colour discrimination requires differential conditioning in bumblebees. *Naturwissenschaften*, 91(5), 224-227.

Erickson, J. M. (1971). The displacement of native ant species by the introduced Argentine ant *Iridomyrmex humilis* Mayr. *Psyche: A Journal of Entomology*, 78(4), 257-266.

Faehl, L. G., y Ballard, J. B. (2001). U.S. Patent No. 6,245,327. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Falibene, A., y Josens, R. (2012). Sucrose acceptance threshold: a way to measure sugar perception in ants. *Insectes sociaux*, 59(1), 75-80.)

Fitzgerald, K., Heller, N., y Gordon, D. M. (2012). Modeling the spread of the Argentine ant into natural areas: Habitat suitability and spread from neighboring sites. *Ecological modelling*, 247, 262-272.

Fowler, H. G., Bueno, O. C., Sadatsune, T., y Montelli, A. C. (1993). Ants as potential vectors of pathogens in hospitals in the state of São Paulo, Brazil. *International Journal of Tropical Insect Science*, 14(3), 367-370.

Gibson, R. L., y Scott, J. G. (1989). Comparative toxicity of fourteen insecticides to two species of carpenter ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of economic entomology*, 82(4), 1121-1124.

Global Invasive Species Database (2020). Descargado de http://www.iucngisd.org/gisd/100_worst.php on 02-03-2020

Gordon, D. M., y Heller, N. E. (2014). The invasive Argentine ant *Linepithema humile* (Hymenoptera: Formicidae) in Northern California reserves: from foraging behavior to local spread. *Myrmecol News*, 19, 103-110.

Gordon, M. D., y Scott, K. (2009). Motor control in a *Drosophila* taste circuit. *Neuron*, 61(3), 373-384.

Greenberg, L., Klotz, J. H., y Rust, M. K. (2006). Liquid borate bait for control of the Argentine ant, *Linepithema humile*, in organic citrus (Hymenoptera: Formicidae). *Florida Entomologist*, 89(4), 469-474.

Greenberg, L., Rust, M. K., Wright, S., y Choe, D. H. (2017). Argentine ant control around homes: efficacy of treatments and urban runoff. *International Journal of Pest Management*, 63(3), 242-250.

Grimm, N. B., Grove, J. G., Pickett, S. T., y Redman, C. L. (2000). Integrated approaches to long-term studies of urban ecological systems: Urban ecological systems present multiple challenges to ecologists—pervasive human impact and extreme heterogeneity of cities, and the need to integrate social and ecological approaches, concepts, and theory. *BioScience*, 50(7), 571-584.

Guerrieri, F. J., y d'Ettorre, P. (2010). Associative learning in ants: conditioning of the maxilla-labium extension response in *Camponotus aethiops*. *Journal of insect physiology*, 56(1), 88-92.

Heller, N. E. (2004). Colony structure in introduced and native populations of the invasive Argentine ant, *Linepithema humile*. *Insectes Sociaux*, 51(4), 378-386.

Hölldobler, B., y Wilson, E. O. (1990). The ants. *Harvard University Press*.

Hölldobler, B., y Wilson, E. O. (2008). *The superorganism: the beauty, elegance, and strangeness of insect societies*, 1st edn New York. NY: WH Norton y Company.

Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian journal of statistics*, 65-70.

Holway, D. A. (1998). Effect of Argentine ant invasions on ground-dwelling arthropods in northern California riparian woodlands. *Oecologia*, 116(1-2), 252-258.

Holway, D. A. (1999). Competitive mechanisms underlying the displacement of native ants by the invasive Argentine ant. *Ecology*, 80(1), 238-251.

Holway, D. A., Suarez, A. V., y Case, T. J. (1998). Loss of intraspecific aggression in the success of a widespread invasive social insect. *Science*, 282(5390), 949-952.

Hooper-Bùi, L. M., y Rust, M. K. (2001). An oral bioassay for the toxicity of hydramethylnon to individual workers and queens of Argentine ants, *Linepithema humile*. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 57(11), 1011-1016.

Human, K. G., y Gordon, D. M. (1996). Exploitation and interference competition between the invasive Argentine ant, *Linepithema humile*, and native ant species. *Oecologia*, 105(3), 405-412.

Jordan, M., Meyer, W. B., Kates, R. W., Clark, W. C., Richards, J. F., Turner, B. L., y Mathews, J. T. (1990). The earth as transformed by human action: global and regional changes in the biosphere over the past 300 years. CUP Archive.

Josens, R. B., Farina, W. M., y Roces, F. (1998). Nectar feeding by the ant *Camponotus mus*: intake rate and crop filling as a function of sucrose concentration. *Journal of Insect Physiology*, 44(7), 579-585.



Josens, R. B., y Roces, F. (2000). Foraging in the ant *Camponotus mus*: nectar-intake rate and crop filling depend on colony starvation. *Journal of Insect Physiology*, 46(7), 1103-1110.

Josens, R., Eschbach, C., y Giurfa, M. (2009). Differential conditioning and long-term olfactory memory in individual *Camponotus fellah* ants. *Journal of Experimental Biology*, 212(12), 1904-1911.

Josens, R., Sola, F. J., Marchisio, N., Di Renzo, M. A., y Giacometti, A. (2014). Knowing the enemy: ant behavior and control in a pediatric hospital of Buenos Aires. *SpringerPlus*, 3(1), 229.

Josens, R., Sola, F., Lois-Milevicich, J., y Mackay, W. (2017). Urban ants of the city of Buenos Aires, Argentina: species survey and practical control. *International Journal of Pest Management*, 63(3), 213-223.

Kaukeinen, D. E., y Buckle, A. P. (1992). Evaluation of aversive agents to increase the selectivity of rodenticides with emphasis on denatonium benzoate (Bitrex®) bittering agent. In *Proceedings of the Vertebrate Pest Conference* (Vol. 15, No. 15).

Kay, A. (2002). Applying optimal foraging theory to assess nutrient availability ratios for ants. *Ecology*, 83(7), 1935-1944.

Kay, A. (2004). The relative availabilities of complementary resources affect the feeding preferences of ant colonies. *Behavioral Ecology*, 15(1), 63-70.

Kennedy, T. A. (1998). Patterns of an invasion by Argentine ants (*Linepithema humile*) in a riparian corridor and its effects on ant diversity. *The American midland naturalist*, 140(2), 343-350.

Kim, U. K., Jorgenson, E., Coon, H., Leppert, M., Risch, N., y Drayna, D. (2003). Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. *Science*, 299(5610), 1221-1225.

Kim, U., Wooding, S., Ricci, D., Jorde, L. B., y Drayna, D. (2005). Worldwide haplotype diversity and coding sequence variation at human bitter taste receptor loci. *Human mutation*, 26(3), 199-204.

Kleinkauf, A., MacDonald, D. W., y Tattersall, F. H. (1999). A bitter attempt to prevent non-target poisoning of small mammals. *Mammal Review*, 29(3), 201-204.

Klotz, J. H., Greenberg, L., Amrhein, C., y Rust, M. K. (2000). Toxicity and repellency of borate-sucrose water baits to Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology*, 93(4), 1256-1258.

Krushelnycky, P. D., Joe, S. M., Medeiros, A. C., Daehler, C. C., y Loope, L. L. (2005a). The role of abiotic conditions in shaping the long-term patterns of a high-elevation Argentine ant invasion. *Diversity and Distributions*, 11(4), 319-331.

Krushelnycky, P. D., Loope, L. L., y Reimer, N. J. (2005b). The ecology, policy, and management of ants in Hawaii.

Kusnezov, N. (1951) El género *Camponotus* en la Argentina (Hymenoptera, Formicidae). *Acta Zoológica Lilloana* XII: 182-252.

Lach, L., Parr, C. L., y Abbott, K. L. (2010). Ant ecology. *Oxford University Press*.

Lawton, J. H., y Heads, P. A. (1984). Bracken, ants and extrafloral nectaries. I. The components of the system. *The Journal of Animal Ecology*, 995-1014.

Lee, C. Y. (2008, April). Sucrose bait base preference of selected urban pest ants (Hymenoptera: Formicidae). In Proceedings of the Sixth International Conference on Urban Pests. OOK-Press Kft, Veszprém (pp. 59-63).

Levieux, J., y Louis, D. (1975). La nutrition des fourmis tropicales II. Comportement alimentaire et régime de *Camponotus vividus* (Smith) (Hymenoptera Formicidae) comparaison intragénérique. *Insectes sociaux*, 22(4), 391-403.

Lois-Milevicich, J. (2016). Tesis de Licenciatura: Control de hormigas: Comportamiento de ingestión de cebos y sus bases fisiológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

Mailleux, A. C., Claire, D., y Jean-Louis, D. (2006). A threshold triggering ant trail-laying modified by starvation.

Mailleux, A. C., Buffin, A., Detrain, C., y Deneubourg, J. L. (2010). Recruiter or recruit: who boosts the recruitment in starved nests in mass foraging ants? *Animal behaviour*, 79(1), 31-35.

Mailleux, A. C., Deneubourg, J. L., y Detrain, C. (2000). How do ants assess food volume? *Animal behaviour*, 59(5), 1061-1069.

Mailleux, A. C., Detrain, C., y Deneubourg, J. L. (2005). Triggering and persistence of trail-laying in foragers of the ant *Lasius niger*. *Journal of insect physiology*, 51(3), 297-304.

Marella, S., Fischler, W., Kong, P., Asgarian, S., Rueckert, E., & Scott, K. (2006). Imaging taste responses in the fly brain reveals a functional map of taste category and behavior. *Neuron*, 49(2), 285-295.

Mc Cabe, S., Farina, W. M., y Josens, R. B. (2006). Antennation of nectar-receivers encodes colony needs and food-source profitability in the ant *Camponotus mus*. *Insectes Sociaux*, 53(3), 356-361.

McFarland, D. J. (1971). Feedback Mechanisms in Animal Behaviour. *Academic Press*, London/New York.

McKinney, M. L. (2002). Urbanization, Biodiversity, and Conservation: The impacts of urbanization on native species are poorly studied, but educating a highly urbanized human population about these impacts can greatly improve species conservation in all ecosystems. *Bioscience*, 52(10), 883-890.

Medan, V., y Josens, R. B. (2005). Nectar foraging behaviour is affected by ant body size in *Camponotus mus*. *Journal of Insect Physiology*, 51(8), 853-860.

Menke, S. B., y Holway, D. A. (2006). Abiotic factors control invasion by Argentine ants at the community scale. *Journal of animal ecology*, 75(2), 368-376.

Moreira, D., Morais, V. D., Vieira-da-Motta, O., Campos-Farinha, A. E. D. C., y Tonhasca Jr, A. (2005). Ants as carriers of antibiotic-resistant bacteria in hospitals. *Neotropical Entomology*, 34(6), 999-1006.

Newell W. y Barber T.C. (1913). The Argentine ant. Bulletin of the U.S. Department of Agriculture, *Bureau of Entomology*, 122. 98p

Newell, W. (1908). Notes on the habits of the Argentine or New Orleans ant, *Iridomyrmex* Mayr.

Núñez, J. A., y Giurfa, M. (1996). Motivation and regulation of honey bee foraging. *Bee World*, 77(4), 182-196.

Nyamukondiwa, C., y Addison, P. (2011). Preference of foraging ants (Hymenoptera: Formicidae) for bait toxicants in South African vineyards. *Crop Protection*, 30(8), 1034-1038.

O.J. Dunn (1964). Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics*, 6, 241-252

O'brien, K. S., y Hooper-Bui, L. M. (2005). Hunger in red imported fire ants and their behavioral response to two liquid bait products. *Journal of economic entomology*, 98(6), 2153-2159.

O'Donnell, S., y Bulova, S. J. (2007). Worker connectivity: a review of the design of worker communication systems and their effects on task performance in insect societies. *Insectes Sociaux*, 54(3), 203-210.

Oi, D. H. (2008). Pharaoh ants and fire ants. Public Health Significance of Urban Pests. WHO, Copenhagen, 175-208.

OLAYA-MASMELA, L. A., Chacón, E. P., y Payán, A. (2005). Hormigas (Hymenoptera: Formicidae) en centros hospitalarios del Valle del Cauca como vectores de patógenos nosocomiales. *Revista Colombiana de Entomología*.

Palumbi, S. R. (2001). Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science*, 293(5536), 1786-1790.

Passera, L., y Passera, L. (1994). Characteristics of tramp species.

Paul, J., y Roces, F. (2003). Fluid intake rates in ants correlate with their feeding habits. *Journal of Insect Physiology*, 49(4), 347-357.



Paul, J., y Roces, F. (2003). Fluid intake rates in ants correlate with their feeding habits. *Journal of Insect Physiology*, 49(4), 347-357.

Paul, J., Roces, F., y Hölldobler, B. (2002). How do ants stick out their tongues? *Journal of Morphology*, 254(1), 39-52.

Payne, H. (1988). Bitrex® -a bitter solution to safety. *Chemistry and Industry*, 721-3.

Perera, D. R., Armstrong, G., y Senanayake, N. (2000). Effect of antifeedants on the diamondback moth (*Plutella xylostella*) and its parasitoid *Cotesia plutellae*. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 56(5), 486-490.

Pronin, A. N., Xu, H., Tang, H., Zhang, L., Li, Q., y Li, X. (2007). Specific alleles of bitter receptor genes influence human sensitivity to the bitterness of aloin and saccharin. *Current Biology*, 17(16), 1403-1408.

Ramaswamy, S. B., Cohen, N. E., y Hanson, F. E. (1992). Deterrence of feeding and oviposition responses of adult *Heliothis virescens* by some compounds bitter-tasting to humans. *Entomologia experimentalis et applicata*, 65(1), 81-93.

Robertson, H. M., Warr, C. G., & Carlson, J. R. (2003). Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(suppl 2), 14537-14542.

Robertson, H. M., y Wanner, K. W. (2006). The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family. *Genome research*, 16(11), 1395-1403.

Rodrigues, J. (2007). How ants determine the number of potential recruits. *Ecological modelling*, 200(3-4), 384-392.

Rust, M. K., y Su, N. Y. (2012). Managing social insects of urban importance. *Annual review of entomology*, 57, 355-375.

Rust, M. K., Reiersen, D. A., y Klotz, J. H. (2004). Delayed toxicity as a critical factor in the efficacy of aqueous baits for controlling Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology*, 97(3), 1017-1024.

Sackmann, P., Corley, J. C., Masciocchi, M., y Novas, G. (2010). Effects of the bittering agent denatonium benzoate on the success of toxic baiting of pestiferous German wasps (*Vespula germanica*). *International journal of pest management*, 56(1), 69-74.

Santos, P. F. D., Fonseca, A. R., y Sanches, N. M. (2009). Formigas (Hymenoptera: Formicidae) como vetores de bactérias em dois hospitais do município de Divinópolis, Estado de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(5), 565-569.

Schilman, P. E., y Roces, F. (2003). Assessment of nectar flow rate and memory for patch quality in the ant *Camponotus rufipes*. *Animal Behaviour*, 66(4), 687-693.

Schilman, P. E., y Roces, F. (2006). Foraging energetics of a nectar-feeding ant: metabolic expenditure as a function of food-source profitability. *Journal of experimental biology*, 209(20), 4091-4101.

Schilman, P. E., Lighton, J. R., y Holway, D. A. (2005). Respiratory and cuticular water loss in insects with continuous gas exchange: comparison across five ant species. *Journal of Insect Physiology*, 51(12), 1295-1305.

Schilman, P. E., y Roces, F. (2003). Assessment of nectar flow rate and memory for patch quality in the ant *Camponotus rufipes*. *Animal Behaviour*, 66(4), 687-693.

Seeley, T. D. (1989). The honey bee colony as a superorganism. *American Scientist*, 77(6), 546-553.

Sibert, J. R., y Frude, N. (1991). Bittering agents in the prevention of accidental poisoning: children's reactions to denatonium benzoate (Bitrex®). *Emergency Medicine Journal*, 8(1), 1-7.

Silverman, J., y Brightwell, R. J. (2008). The Argentine ant: challenges in managing an invasive unicolonial pest. *Annu. Rev. Entomol.*, 53, 231-252.

Silverman, J., y Brightwell, R. J. (2008). The Argentine ant: challenges in managing an invasive unicolonial pest. *Annu. Rev. Entomol.*, 53, 231-252.



Silverman, J., y Brightwell, R. J. (2008). The Argentine ant: challenges in managing an invasive unicolonial pest. *Annu. Rev. Entomol.*, 53, 231-252.

Silverman, J., y Roulston, T. A. H. (2001). Acceptance and intake of gel and liquid sucrose compositions by the Argentine ant (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology*, 94(2), 511-515.

Silverman, J., y Roulston, T. A. H. (2001). Acceptance and intake of gel and liquid sucrose compositions by the Argentine ant (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology*, 94(2), 511-515.

Smith, M. R. (1965). House-infesting ants of the eastern United States (No. 1488-2016-123727).

Smith, C. R., Smith, C. D., Robertson, H. M., Helmkampf, M., Zimin, A., Yandell, M., ... y Cash, E. (2011a). Draft genome of the red harvester ant *Pogonomyrmex barbatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(14), 5667-5672.

Smith, C. D., Zimin, A., Holt, C., Abouheif, E., Benton, R., Cash, E., ... y Fave, M. J. (2011b). Draft genome of the globally widespread and invasive Argentine ant (*Linepithema humile*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(14), 5673-5678.

Sola, F., Falibene, A., y Josens, R. (2013). Asymmetrical behavioral response towards two boron toxicants depends on the ant species (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of economic entomology*, 106(2), 929-938.).

Sola, F. J. (2015). Recolección de cebos en hormigas urbanas: comportamiento de la hormiga *Linepithema humile* (Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).

Sola, F. J., y Josens, R. (2016). Feeding behavior and social interactions of the Argentine ant *Linepithema humile* change with sucrose concentration. *Bulletin of entomological research*, 106(4), 522-529.

Soranzo, N., Bufe, B., Sabeti, P. C., Wilson, J. F., Weale, M. E., Marguerie, R., ... y Goldstein, D. B. (2005). Positive selection on a high-sensitivity allele of the human bitter-taste receptor TAS2R16. *Current Biology*, 15(14), 1257-1265.

Soroker, V., Vienne, C., y Hefetz, A. (1995). Hydrocarbon dynamics within and between nestmates in *Cataglyphis niger* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Chemical Ecology*, 21(3), 365-378.

Stringer Jr, C. E., Lofgren, C. S., y Bartlett, F. J. (1964). Imported fire ant toxic bait studies: evaluation of toxicants. *Journal of Economic Entomology*, 57(6), 941-945.

Suarez, A. V., Bolger, D. T., y Case, T. J. (1998). Effects of fragmentation and invasion on native ant communities in coastal southern California. *Ecology*, 79(6), 2041-2056.

Tsutsui, N. D., Suarez, A. V., Holway, D. A., y Case, T. J. (2000). Reduced genetic variation and the success of an invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(11), 5948-5953.

Vitousek, P. M., Mooney, H. A., Lubchenco, J., y Melillo, J. M. (1997). Human domination of Earth's ecosystems. *Science*, 277(5325), 494-499.

Ward, P. S. (1987). Distribution of the introduced Argentine ant (*Iridomyrmex humilis*) in natural habitats of the lower Sacramento Valley and its effects on the indigenous ant fauna. University of California.

Wild, A. L. (2004). Taxonomy and distribution of the Argentine ant, *Linepithema humile* (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 97(6), 1204-1215.

Wilson, E. O., y Eisner, T. (1957). Quantitative studies of liquid food transmission in ants. *Insectes sociaux*, 4(2), 157-166.

Witmer, G. W., Pipas, M. J., y Bucher, J. C. (1998). Field tests of denatonium benzoate to reduce seedling damage by pocket gophers (*Thomomys talpoides* Rich.). *Crop Protection*, 17(1), 35-39.

Xu, W., Papanicolaou, A., Zhang, H. J., y Anderson, A. (2016). Expansion of a bitter taste receptor family in a polyphagous insect herbivore. *Scientific Reports*, 6, 23666.

Yarmolinsky, D. A., Zuker, C. S., y Ryba, N. J. (2009). Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell*, 139(2), 234-244.

Zhang, Z. Q. (2011). Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. *Magnolia press*.





Anexo

Correlación entre masa de cebo ingerida y tiempo de ingesta

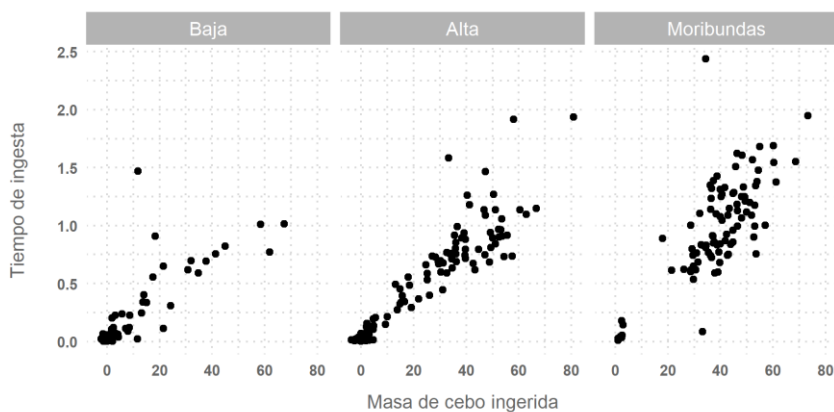


Fig. 16. En el contexto experimental del presente trabajo, el tiempo de ingesta de una solución azucarada correlacionó con la masa de cebo ingerida relativa con *C.mus*, en las tres motivaciones evaluadas. Coeficientes de Pearson = 0.84 (Baja), 0.94 (Alta), 0.77 (Moribundas); p-valor < 0.05 en todos los casos.

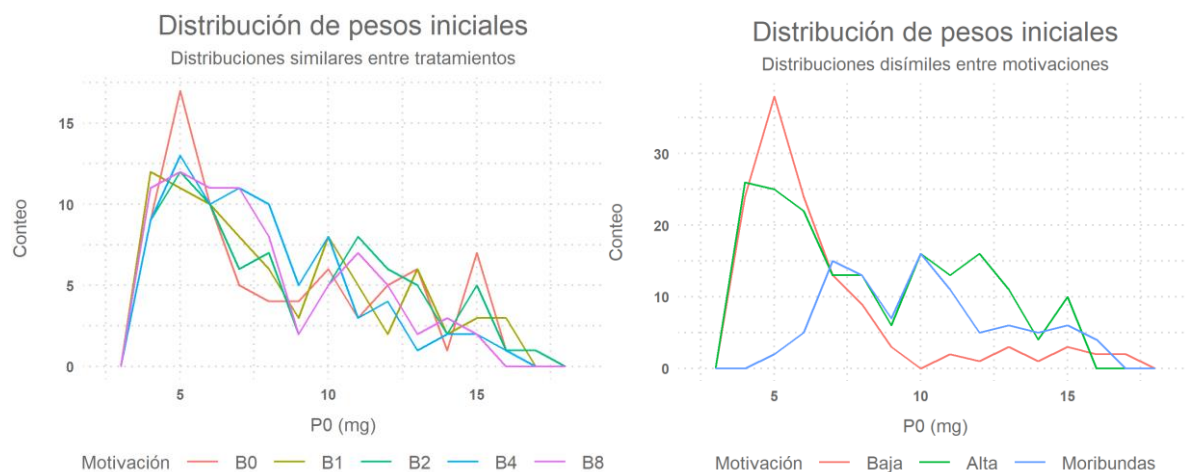


Fig. 17. La distribución de pesos iniciales no difiere significativamente entre tratamientos (panel izquierdo), pero sí entre motivaciones (panel derecho).





Agradecimientos

A Roxy, por su presencia y dedicación; pero, sobre todo, por su comprensión, por entenderme en mis caminos académicos y por su infinita paciencia guiándome en tiempos de COVID-19 y acompañándome en la escritura hasta altas horas de la noche cuando los tiempos apremiaban ¡Gracias!

A la gente del laboratorio de Insectos Sociales por brindarme el espacio de trabajo y acompañarme con mates, consejos y apoyo siempre que lo necesité.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales que, sin olvidar el negado elitismo que la subyace, son incontables sus bondades y es inmensa su calidez, habiendo sido mi hogar durante los últimos 7 años de mi vida y habiéndome hecho crecer académica, artística y personalmente.

A Alexandra Elbakyan por darme la posibilidad de leer e incorporar toda la bibliografía que nutrió a este trabajo y liderar el camino de ruptura con el sistema científico capitalista, privatista y excluyente que rige hoy en día.

A la Lic. Adriana Tomalino y al Dr. Eduardo Passeron de Binka S.A. por la donación del Bitrex

A la Dra. Gabriela De Brito Sanchez por las productivas charlas sobre receptores gustativos.

A Iván Caro, Simone Alegre Cornejo y Alejandro Hillar por ayudarme a confeccionar la imagen de portada (autoría de Ivo), la figura 7 y los encabezados de este trabajo.

A Matías Grimberg por ayudarme a armar los programas que usé para procesar los datos.

A Laura Calfayán, Jimena Lois-Milevicich y Leonardo Versaci por luchar junto a mi contra los datos indomables y aconsejarme en el desarrollo de la estadística utilizada.



A mi familia, por ser mi sostén y acompañarme durante toda la carrera dándome su apoyo en cada camino que transité.

A mis amigos, que son mi apoyo emocional. A les de toda la vida, por seguir estando. A les amigos que Exactas me dejó, porque sin ellos mi tránsito por la facultad no habría sido tan feliz y hermoso. Me ayudaron a crecer inconmensurablemente, son lo mejor que me llevo de estos años. Les amo.

A Luna. *Yo tengo Luna llena todos los días.*



