

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Centro Interdisciplinario de Investigación para el
Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca



MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y
APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES

Efecto de la dureza del pellet en la mortalidad del nematodo
entomopatógeno *Steinernema glaseri* encapsulado mecánicamente

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA

Mayolo Mendoza Pérez

Directores de tesis:

Dr. Pastor Teodoro Matadamas Ortiz

Dr. Juan Alejandro Vazquez Feijoo

Santa Cruz Xoxocotlán, Oax. Febrero 2012



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 03 del mes de febrero del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA)** para examinar la tesis de grado titulada: "Efecto de la dureza del pellet en la mortalidad del nematodo entomopatígeno *Steinernema glaseri* encapsulado mecánicamente"

Presentada por el alumno:


Mendoza Apellido paterno	Pérez materno	Mayolo nombre(s)	Con registro:						
			A	1	0	0	2	0	0

aspirante al grado de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**


Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA


Directores de tesis


Dr. Pastor Teodoro Matadamás Ortiz

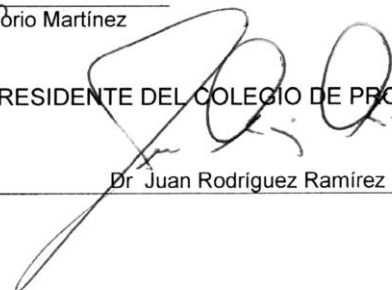

Dr. Juan Alejandro Vazquez Feijoo


Dr. Jaime Ruiz Vega


Dr. Magdaleno Caballero Caballero


M. en C. Sabino Honorio Martínez
Tomás

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Juan Rodríguez Ramírez



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACION PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día **03** del mes **febrero** del año **2012**, el (la) que suscribe **Mendoza Pérez Mayolo** alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro **A100200**, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de los Dres. Pastor Teodoro Matadamas Ortiz y Juan Alejandro Vazquez Feijoo y cede los derechos del trabajo titulado: "Efecto de la dureza del pellet en la mortalidad del nematodo entomopatógeno *Steinernema glaseri* encapsulado mecánicamente" al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: posgradoax@ipn.mx ó mayonce@hotmail.com Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Mendoza Pérez Mayolo



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACION PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.

Resumen

La aplicación de plaguicidas químicos ha provocado daños al medio ambiente y a los seres vivos, haciendo necesario el desarrollo de bioproductos con agentes de control biológico efectivos que contrarresten dichos efectos. En el CIIDIR Oaxaca se han formulado, manual y mecánicamente, bioplaguicidas en gránulos (pellets) con nematodos entomopatógenos de la especie *Steinernema glaseri*; el tiempo de supervivencia de los nematodos para los primeros fue de 4 días (Girón, 2008), en tanto que los segundos tuvieron peso y esfericidad uniformes al 90 % (Matadamas, 2010), por lo que el objetivo del presente fue investigar cuál es el efecto de las operaciones mecánicas de pelletizado y la dureza del pellet en el tiempo de supervivencia. Los nematodos *S. glaseri* fueron encapsulados en tierra diatomea y atapulguita en diferentes proporciones. El método mecánico de pelletización fue el propuesto por Espinosa (2005), almacenando los pellets a temperatura ambiente de 17-29 °C. La prueba de dureza se realizó bajo la norma ASAE 363.3 y el conteo de los nematodos sobrevivientes se realizó a diario con el método de Chen y Glazer (2005). Los datos fueron procesados por ANVA y comparación de medias por la prueba de Tukey al 0.05. Los resultados muestran que el proceso de encapsulamiento mecánico duplica el tiempo de supervivencia de los nematodos reportado para los elaborados manualmente. La supervivencia de los nematodos en los 3 primeros días es del 100%, la cual va disminuyendo gradualmente. Los mejores resultados se obtuvieron con los pellets elaborados con tierra diatomea (Celite 209) y mucílago de nopal, registrando mortalidad de 22 % al día 8. Las pruebas estadísticas muestran un coeficiente de correlación igual a 0.030 lo que comprueba que no existe efecto de la dureza en la supervivencia de nematodos, si bien esta variable no resultó determinante, se calculó el rango de dureza con los que se obtuvieron los mejores resultados de supervivencia que son entre 82.51 y 121.25 g/mm². Se concluye que el proceso mecánico utilizado y la dureza de los pellets obtenidos son adecuados para la producción masiva de este tipo de bioplaguicida.

Palabras Clave: Bioplaguicidas, Formulaciones, Supervivencia, Pellets, *Steinernema glaseri*.

Abstract

The application of chemical pesticides has caused damage to the environment and humans, plants and animals, necessitating the development of bioproducts with effective biological control agents to counteract these effects. In Oaxaca CIIDIR have been made, manually and mechanically, biopesticides as granules (pellets) with entomopathogenic nematodes of the species *Steinernema glaseri*, the survival time of nematodes for the first was 4 days (Giron, 2008), while the latter were uniform weight and sphericity 90% (Matadamas, 2010), so the objective of this of this document is to investigate what the effect of the mechanical operations of pelleting and pellet hardness on survival time. Nematodes *S.glaseri* were encapsulated in diatomaceous earth and attapulgate in different proportions. The mechanical method of pelletization was proposed by Espinosa (2005), storing the pellets at room temperature of 17-29 °C. The hardness test was conducted under the standard ASAE 363.3 and counting of surviving nematodes was conducted daily with the method of Chen and Glazer (2005). The data were processed by ANOVA and mean comparisons by the Tukey test at 0.05. The results show that the mechanical encapsulation process doubles the time of survival of the nematodes reported for manually processed. The survival of nematodes in the first 3 days is 100%, which gradually decreases. The best results were obtained with pellets made from diatomaceous earth (Celite 209) and cactus mucilage, posting 22% mortality at day 8. Statistical tests showed no effect of hardness on the survival of nematodes. Although the variable was not decisive, we calculated a range of 82.51 to 121.25 hardness g / mm² with which it had the best survival results. It is concluded that the mechanical process used and the hardness of the pellets obtained are suitable for mass production of such biopesticide.

Keywords: Biopesticides, Formulations, Survival, Pellets, *Steinernema glaseri*.

Dedicatoria

A mi familia: mis padres Crispín y Antonina, hermanos Ira y Alex, tí@s, prim@s y sobrin@s. En especial, con cariño a Yane.

A la familia Martínez López, Sra. Flora con gratitud y cariño.

A la memoria de mis abuelos: Manuel, Lidia y Genaro (q.e.p.d.) que siempre están en mi pensamiento.

A mamá Benita.

A Betza.

A mis tíos-amigos Pedrito y Cheyo.

Agradecimientos

Al Instituto Politécnico Nacional y al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca por la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Programa Institucional de Formación de Investigadores del IPN por el apoyo recibido.

A mi consejero de estudios y director de tesis, Dr. Pastor Teodoro Matadamas Ortiz, por permitirme participar en sus proyectos de investigación, compartir sus conocimientos y experiencia, por su guía, confianza y respeto durante la realización de la maestría y la tesis.

A Dr. Juan Alejandro Vazquez Feijoo, director de tesis por su paciencia, por sus atinadas sugerencias y correcciones, resultado de su amplio conocimiento científico.

Al comité tutorial y comisión revisora de tesis: Dr. Jaime Ruiz Vega, Dr. Magdaleno Caballero Caballero y M. en C. Sabino Honorio Martínez Tomás, por enriquecer esta tesis con sus comentarios y recomendaciones.

A los profesores-investigadores de la Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales, en especial a la Dra. Mara Rosas Baños, por permitirme participar en sus proyectos de investigación.

Al Dr. Teodulfo Aquino Bolaños, por su orientación, apoyo y facilidades otorgadas para el trabajo experimental en el Laboratorio de Control Biológico.

Al M. en C. Sergio Girón Pablo por su apoyo operativo y logístico, por su asesoría y confianza pero ante todo por su amistad.

Al Ing. Cayetano Serrano Blanco, por su invaluable amistad y apoyo moral.

A mis compañeros Heriberto, Jorge, Andrés, Idarh y Héctor por su apoyo operativo en todo momento.

A mis compañeros y amigos de la maestría, Juan, David, Alma, Norma, Hortensia, Dainíz, Emilio, Paco, Jesús y Héctor.

Contenido

	Pág.
Resumen	I
Abstract	II
Índice de cuadros	VII
Índice de figuras	VIII
Introducción	1
Planteamiento del problema	4
Justificación	5
Objetivo general	7
Objetivos específicos	7
Hipótesis	7
Capítulo 1. Revisión de Literatura	9
1.1 Fisiología del nematodo entomopatógeno <i>Steinernema glaseri</i>	9
1.2 Formulaciones con nematodos entomopatógenos	11
1.3 Técnicas para conservar las formulaciones	13
1.4 Procesos de elaboración de pellets con nematodos entomopatógenos	14
Capítulo 2. Marco Teórico	18
2.1 Dureza	18
2.2 El ensayo a compresión	18
2.3 Propiedades físicas del material y formación de la estructura del pellet	20
Capítulo 3. Materiales y Métodos	24
3.1 Reproducción de nematodos para la experimentación	24
3.2 Aclimatación y dosificación de los nematodos para pelletizar	26
3.3 Proceso de encapsulamiento mecánico	26
3.4 Almacenamiento y determinación de la humedad	27
3.5 Prueba de dureza	28
3.6 Determinación del porcentaje de supervivencia de los nematodos	30
3.7 Análisis cualitativo con microscopía electrónica	30
3.8 Diseño experimental y análisis estadístico de resultados	31
Capítulo 4. Resultados y discusión	36
4.1 Supervivencia de nematodos en dos materiales granulares y tres niveles de ventilación	36
4.2 Supervivencia de nematodos en dos proporciones de materiales granulares y tres componentes de la solución acuosa	38
4.3 Determinación de la resistencia última a la compresión (ruc) de los pellets	42

4.4 Determinación del contenido de humedad de los pellets obtenidos de los diferentes tratamientos	43
4.5 Análisis para determinar la correlación entre las variables dureza y supervivencia	45
4.6 Rango de dureza calculado para mantener una supervivencia de nematodos de 50 y 95%	46
4.7 Supervivencia obtenida al variar el material biológico en el proceso de encapsulamiento mecánico	47
4.8 Análisis cualitativo de microestructura por medio de SEM	49
Capítulo 5. Conclusiones	51
Bibliografía	52

Índice de cuadros

	Pág.	
Cuadro 1	Propiedades físicas y químicas de la Tierra Diatomea, Celite 209	21
Cuadro 2	Propiedades físicas y químicas de la Atapulguita, Min U Gel 400	21
Cuadro 3	Diseño experimental para contrastar el encapsulamiento manual con el realizado de manera mecánica	32
Cuadro 4	Diseño experimental para analizar el efecto de los componentes de la solución acuosa sobre el tiempo de supervivencia.	33
Cuadro 5	Diseño experimental para analizar el efecto de los componentes de la solución acuosa y recubrimiento del pellet sobre el tiempo de supervivencia	34
Cuadro 6	Supervivencia de nematodos encapsulados mediante proceso mecánico.	36
Cuadro 7	Diferencias en la supervivencia de nematodos encapsulados mediante proceso mecánico, registradas al día 6.	37
Cuadro 8	Supervivencia de nematodos observada al variar los componentes de la solución acuosa, en dos proporciones de materiales granulares y aplicando un recubrimiento superficial.	39
Cuadro 9	Diferencia en supervivencia media de nematodos observada al variar los componentes de la solución acuosa, en dos proporciones de materiales granulares y aplicando un recubrimiento superficial.	40
Cuadro 10	Combinación de materiales y sustratos de la solución acuosa	42
Cuadro 11	Diferencia en la RUC observada en pellets al variar los componentes de la solución acuosa, en dos proporciones de materiales granulares y aplicando un recubrimiento superficial.	43
Cuadro 12	Diferencia en el contenido de humedad observada en pellets al variar los componentes de la solución acuosa, en dos proporciones de materiales granulares y aplicando un recubrimiento superficial.	44
Cuadro 13	Análisis para determinar la correlación entre las variables dureza del pellet y supervivencia de nematodos.	45
Cuadro 14	Rango mínimo y máximo de dureza recomendados para lograr la supervivencia de nematodos de 50 y 95% al día 8.	47
Cuadro 15		

Índice de figuras

	Pág.	
Figura 1	Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos del género <i>Steinernema sp.</i>	2
Figura 2	Vista transversal de la estructura de un pellet con nematodos entomopatógenos.	4
Figura 3	Encapsuladora de nematodos: 1) Dosificador neumático de la solución acuosa conteniendo nematodos 2) Conos de alojamiento del material granular para la formación del pellet 3) Tornillo sinfín transportador-precompactador 4) Disco compactador.	15
Figura 4	Patrón de recubrimiento de la gota de solución acuosa que contiene a los nematodos.	16
Figura 5	5a Modelo del ensayo a compresión de un cuerpo esférico, 5b Modelo del ensayo a compresión de un pellet con 87 % de esfericidad.	19
Figura 6	Diagrama característico de Esfuerzo-Deformación Unitaria de un cuerpo sólido.	20
Figura 7	Metodología para la fase experimental	29
Figura 8	Dispositivo experimental para el ensayo de dureza en pellets con nematodos entomopatógenos.	43
Figura 9	Supervivencia de nematodos encapsulados mediante proceso mecánico.	46
Figura 10	Supervivencia de nematodos observada al variar los componentes de la solución acuosa, en dos proporciones de materiales granulares y aplicando un recubrimiento superficial.	40
Figura 11	Resistencia Última a la Compresión observada en pellets al variar los componentes de la solución acuosa, en dos proporciones de materiales granulares y aplicando un recubrimiento superficial	42
Figura 12	Contenido de humedad observada en pellets al variar los componentes de la solución acuosa, en dos proporciones de materiales granulares y aplicando un recubrimiento superficial.	44
Figura 13	Supervivencia de 15 días de nematodos en pellets elaborados con organismos colectados a los tres días de emerger de la larva	48
Figura 14	Imagen de partículas de tierra diatomea (CELITE 209) tomada por S.E.M voltaje acelerador 20 kV, magnificación 1500x	49

INTRODUCCIÓN

El uso de enemigos naturales para el control de plagas ha existido desde tiempos pasados, quizá el caso más antiguo (hace al menos 800 años), es el que hace referencia al uso de hormigas por agricultores chinos (Barrera, 2007). Aunque como método científico el control biológico surge hacia el final del siglo XIX con el exitoso caso de la introducción desde Australia a California de *R. cardinalis* contra la escama algodonosa de los cítricos *I. purchasi* ocurrido en 1888 (Simmonds et al., 1976).

En México, el control biológico de insectos despertó el interés de los especialistas desde el siglo pasado, pero fue hasta 1942 cuando se realizaron los trabajos de mayor relevancia con la introducción de *Aphelinus mali* para el control del pulgón lanígero del manzano *E. lanigerum* en Coahuila (Barrera, 2007). En tiempos más recientes, se tiene registro de plagas que han sido controladas biológicamente, como son: la broca del café *Hypothenemus hampei* (Barrera et al. 2000), las moscas de la fruta *Anastrepha* spp. (Liedo y Cancino, 2000) y el lirio acuático *Eichhorniae crassipes*, (Arredondo y Hernández, 2002).

El control biológico se ha extendido al uso de una amplia gama de organismos para el control de insectos; entre los usados como agentes de control se incluyen los entomopatógenos, que son microorganismos con la habilidad de parasitar, multiplicarse y matar insectos, para posteriormente diseminarse a otros individuos. Dentro de este grupo se encuentran los virus, bacterias, hongos y nematodos (Wilson y Huffaker, 1976).

Las formulaciones, importación, exportación, envío y liberación de nematodos entomopatógenos (NE) como agentes de control biológico, debe realizarse bajo las directrices indicadas por la Norma Internacional para Medidas Fitosanitarias numero 003 emitida por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (FAO, 2006).

Los NE representan un grupo de invertebrados no segmentados, de la clase *Secernentea*, del orden *Rhabditida*, familia *Steinernematidae* que cuenta con dos géneros *Steinernema* spp. y *Heterorhabditis* spp. Cuentan con aparato excretor, sistema nervioso, aparato

reproductor y sistema muscular (Martínez, 2000), en la agricultura contemporánea se han hecho intentos para utilizarlos en el control de plagas debido a la alta efectividad y especificidad que tienen contra las plagas objetivo (Soler et al. 2003).

Los NE del género *Steinernema spp.* son portadores de la bacteria simbiótica *Xenorhabdus nematophilus* que es liberada una vez que el nematodo entra al organismo del insecto por alguno de sus orificios naturales y que es la causante de la muerte del insecto debido a una grave infección (Burnell y Stock, 2000). Realizada dicha función y agotada la energía proveniente del cadáver, tienden a diseminarse a otros organismos y repetir el ciclo (Stock y Camino, 1996) (Figura 1).

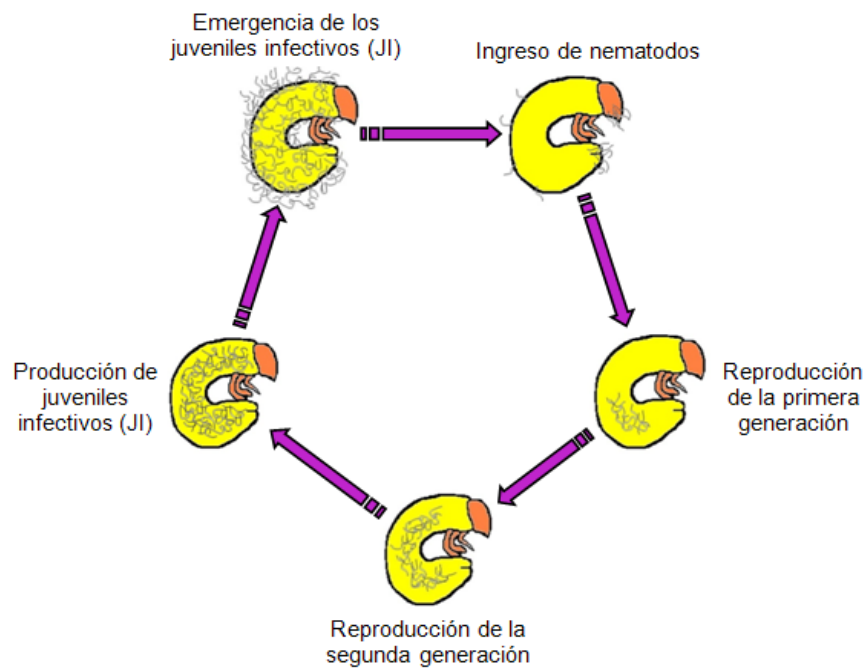


Figura 1. Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos del género *Steinernema spp.*

Es importante mencionar que existen diferencias en el ciclo de vida de los nematodos del género *Steinernema spp.* y *Heterorhabditis spp.*, una de las principales es el desarrollo posterior al estado infectivo. En el primero el juvenil infectivo se desarrolla en macho o hembra pero nunca en hermafrodita, mientras que en el segundo cada juvenil infectivo se convierte en hermafrodita y nunca en macho o hembra (Woodring y Kaya, 1988).

Dentro del género *Steinernema spp.*, García del Pino (1996) reporta la existencia de 33 especies de nematodos, dentro de las cuales, son cinco las que han despertado un mayor interés comercial: *S. feltiae*, *S. carpocapsae*, *S. scapterisci*, *S. riobravisi* y *S. glaseri*.

De estas especies más usadas actualmente para elaborar formulaciones como plaguicidas biológicos, *Steinernema glaseri* es la que posee formas infectivas de mayor tamaño. *S. glaseri* fue descubierta por William Glaser (Steiner, 1929). Entre las cualidades morfológicas y parasíticas de este nematodo se encuentran su alta movilidad lo que incrementa su comportamiento intensivo de búsqueda de huéspedes en capas inferiores del suelo donde parasitan organismos de baja movilidad (García del Pino, 1996). Estos atributos son importantes de conservar en el nematodo al elaborar formulaciones.

S. glaseri está exento de registro por la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) de los Estados Unidos, ya que se ha comprobado que no representa riesgo para el ser humano ni para el medio ambiente (Peng y Black, 1976; Nickle et al., 1998), por lo que puede ser aplicada como bioplaguicida y mantener la inocuidad de los alimentos, al grado de ser permitida para la agricultura orgánica en México (NOM-037-FITO-1995).

Ruiz y Bolaños (2003) demostraron la efectividad de esta especie aplicada en solución acuosa para combatir larvas de gallina ciega *Phyllophaga Vetula* (Coleóptera: Scarabeidae) en cultivos de maíz. Esta plaga afecta el 10% de la superficie cultivada de este grano en el estado de Oaxaca, México, equivalente a 57,784 ha (SAGARPA, 2010), si se considera que este grano es el que se cultiva en la mayor superficie del estado y que es básico en la alimentación de su población, este dato cobra una relevancia de dimensión mayor.

Por lo que Girón (2008), evaluó la efectividad de esta especie aplicada en tres formulaciones, solución acuosa, cadáveres de insectos y pellets sobre larvas de gallina ciega *Phyllophaga Vetula* (Coleóptera: Scarabeidae). Los que fueron aplicados en solución acuosa causaron una mortalidad de 75% de las larvas, los aplicados en cadáveres de

insectos presentaron una mortalidad de 55%, mientras que la mortalidad causada por la aplicación de esta especie en pellet fue similar al testigo que no fue tratado con nematodos.

Los pellets son agregados de material granular, solución acuosa y nematodos entomopatógenos con forma esférica, de diámetro de 10 ± 2 mm (Figura 2).

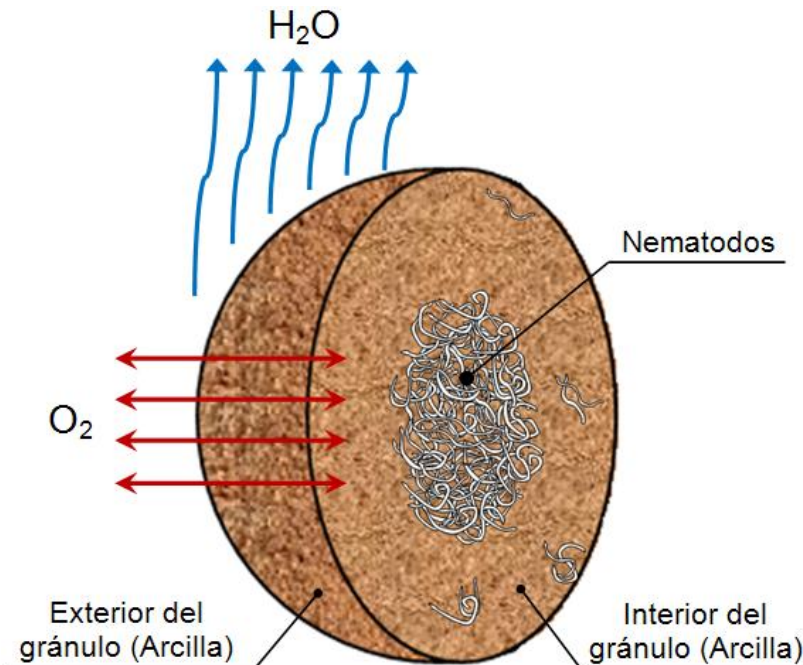


Figura 2. Vista transversal de la estructura de un pellet con nematodos entomopatógenos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los nematodos entomopatógenos son excelentes agentes de control biológico, sin embargo su baja supervivencia en condiciones de almacenamiento es una limitante para su producción masiva de plaguicidas biológicos (Grewal, 2002), por lo que diversas formulaciones han sido probadas con la finalidad de conservar nematodos viables por periodos de tiempo más amplios.

La utilización de nematodos entomopatógenos para el control de plagas agrícolas no ha logrado generalizarse debido a diversas causas como la dificultad y altos costos para la reproducción masiva, para el almacenamiento y envío, la competencia con plaguicidas sintéticos establecidos, la falta de evaluaciones en campo, de demostraciones de seguridad para el usuario y de formulaciones comerciales (Van Driesche y Bellows, 1996). Alatorre

(1999) atribuye en gran parte a esta última la limitada aplicación de nematodos entomopatógenos en la agricultura mexicana.

A partir de los resultados de Girón (2008), quien determinó que la supervivencia de los nematodos pelletizados manualmente fue de solo 4 días, resalta la necesidad de realizar investigaciones abordando los problemas de la baja supervivencia de los nematodos pelletizados (en relación con la formulación acuosa) y la de incrementar el volumen de producción de pellets a través de la mecanización del proceso. El autor estima que resolviendo estos dos problemas se contará con la tecnología para producir pellets con calidad y en cantidades suficientes para implementar su aplicación en campo y evaluar el impacto de esta tecnología. Tan solo en el Estado de Oaxaca existen 57,784 ha de superficie de cultivo de maíz en Oaxaca afectadas anualmente por la plaga de Gallina Ciega (*Phyllophaga Vetula*), con pérdidas anuales de \$ 279.6 millones de pesos (SAGARPA, 2010).

JUSTIFICACIÓN

La protección de cultivos juega un papel vital e integral en la producción agrícola contemporánea. En la actualidad la protección de cultivos se basa principalmente en el uso de productos químicos, se calcula que un 37 % de la producción agrícola mundial se pierde debido a plagas y enfermedades, (Martínez, 2000).

Bolognesi y Morasso (2000) reportan que los ingredientes activos de 56 productos pesticidas químicos habían sido clasificados por diversas Agencias Internacionales como cancerígenos para animales en laboratorio. En un estudio posterior Bolognesi (2003) muestra que los plaguicidas químicos son considerados potencialmente mutágenos, es decir: diversos ingredientes agroquímicos pueden inducir a mutaciones, alteraciones cromosómicas o daño en el ADN, concepto conocido como genotoxicidad.

De acuerdo a Bolognesi (2003), los efectos genotóxicos se presentan en personas que están expuestas por largos periodos de tiempo a determinados plaguicidas químicos, como son los agricultores, los aplicadores de plaguicidas, los trabajadores de las fábricas donde se

elaboran estos productos e incluso no descarta el riesgo por la ingesta de productos agrícolas sometidos a la aplicación de estos plaguicidas.

Aunque en México como en otros países en desarrollo donde son altamente elevados los costos de los insecticidas químicos y frecuente la resistencia de las plagas a éstos, se han hecho intentos por aplicar el control biológico aún se tiene un amplio campo de desarrollo que no ha sido explotado (Greathead y Waage, 1983). Por lo que, de acuerdo con Altieri et al. (1989), el control biológico puede constituir para México y América Latina el método de control de plagas más viable, ecológicamente recomendable y sostenible.

En este contexto, el marco ecológico y social dentro del cual se desarrolla el control biológico en México debe fortalecerse en el corto plazo, ante la amenaza que representan fenómenos como: la privatización de grandes superficies ejidales, la globalización de la economía, la introducción de plantas transgénicas con propiedades insecticidas, la escasa inocuidad alimentaria y la creciente demanda por la agricultura orgánica (Bernal y Quezada, 1999; Arredondo y Hernández, 2002).

Por ello es importante llevar a cabo investigaciones y acciones para impulsar el control biológico que ayuden a mejorar las estrategias de control, concienticen a los agricultores sobre la importancia del control natural, fortalezcan la conservación y preservación de la biodiversidad, mejoren la calidad de los productos formulados y de los enemigos naturales que se utilicen e incrementen la eficiencia de la producción.

En lo particular, sabiendo que los nematodos son afectados por el pH del material envolvente así como fenómenos físicos dentro del pellet, tales como: pérdida de humedad, intercambio de oxígeno (Hazir et al. 2003) y que éstos tienen relación con la dureza de la estructura de la matriz granular, se hace necesario evaluar el efecto de tal dureza sobre el porcentaje de supervivencia de los nematodos durante el tiempo de almacenamiento, con la finalidad de comprender las condiciones de supervivencia para esta especie.

Los puntos anteriores son por sí mismos, campos de exploración muy amplios para esta y futuras investigaciones, debido a que conocimientos científicos derivados de estos trabajos, pueden ser aplicados al encapsulamiento de otras especies de nematodos que también han demostrado su efectividad en el control de otro tipo de plagas agrícolas

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto de la dureza del pellet en el porcentaje de supervivencia del nematodo entomopatógeno *Steinernema glaseri* encapsulado mecánicamente para determinar el rango de dureza adecuado para la producción masiva de pellets.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comprobar el efecto del proceso de elaboración mecánica en la supervivencia de los nematodos entomopatógenos
- Evaluar el tiempo de supervivencia de los nematodos entomopatógenos encapsulados mecánicamente en función de la resistencia mecánica de la estructura del pellet (dureza) controlada con la variación del tipo de material granular y los componentes de la solución acuosa.
- Determinar el rango de dureza adecuado para la producción masiva de pellets.

HIPÓTESIS

El incremento de la dureza del pellet disminuye el porcentaje de supervivencia de los nematodos entomopatógenos de la especie *S. glaseri* encapsulados mecánicamente.

Capítulo 1.

Revisión de literatura

1. REVISIÓN DE LITERATURA

En esta primera sección se presentan los resultados de las investigaciones desarrolladas sobre formulaciones con nematodos entomopatógenos de las familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*, con el fin de aumentar el tiempo de supervivencia en solución acuosa, esponjas sintéticas, cadáveres y gránulos (pellets). Se describen los procesos y materiales utilizados, así como el tiempo de supervivencia logrado en cada uno de ellos.

1.1 FISIOLÓGÍA DEL NEMATODO *Steinernema glaseri*

Steinernema glaseri es la especie comercializada como agente de control biológico, que presenta mayor tamaño (1700 μm) (García del Pino, 1996), dicha fortaleza se considera importante para su pelletización.

Los estudios de thermobiosis y anhidrobiosis revelan que los juveniles infectivos (JI) de los nematodos entomopatógenos utilizan una respuesta de tolerancia al estrés que puede ser activada durante la aclimatación a una temperatura o nuevo régimen de desecación. Una vez que esta respuesta al estrés es inducida, los nematodos adquieren una resistencia a una multitud de factores, como temperatura, desecación, baja oxigenación, la radiación ultravioleta, y el pH (Barrett, 1991).

Los mecanismos fisiológicos manifestados por los JI de los nematodos entomopatógenos durante la supervivencia en condiciones de frío o calor incluyen la alteración de la proporción de grasas saturadas y ácidos grasos insaturados, alteraciones en la actividad de enzimas metabólicas, la síntesis de nuevas isoenzimas, azúcares y polioles como trehalosa y glucosa, y las proteínas de choque térmico (Grewal et al. 2006).

Teóricamente, los nematodos, al igual que otros organismos tales como bacterias, hongos, protozoos y plantas, pueden sobrevivir en condiciones desfavorables del medio ambiente en un estado de latencia, que prolonga considerablemente su vida y les permite soportar los rigores de un entorno cambiante (Barrett, 1991; Wharton, 2003).

De acuerdo a Barret (1991), la latencia se puede separar en diapausa y quietud. Diapausa es un estado de desarrollo detenido que no se reanuda hasta que los requerimientos específicos hayan sido cubiertos, esto es, hasta que regresen a las condiciones apropiadas del ambiente. La quietud es una respuesta facultativa en la que se presenta un bajo metabolismo, impredecible para condiciones desfavorables del medio ambiente y es fácilmente reversible cuando éstas cambian a condiciones favorables. Si la tensión persiste, algunos organismos pueden entrar a un estado de criptobiosis, estado en el que no hay metabolismo mensurable.

Las condiciones ambientales desfavorables incluyen ausencia de agua, temperaturas extremas, falta de oxígeno, y estrés osmótico. Los tipos de quietud inducidas en organismos por estas condiciones se denominan anhidrobiosis, thermobiosis y cryobiosis, anoxybiosis y osmobiosis, respectivamente (Barrett, 1991). Debido a que durante la permanencia en el pellet, el nematodo estará bajo condiciones de humedad limitada (anhidrobiósis), bajo nivel de intercambio de oxígeno con el exterior (anoxybiosis). Del mismo modo, aumentan las concentraciones de soluto sobre la sequedad del pellet (osmobiosis). Por lo tanto, la desecación de los nematodos es comúnmente acompañado de pre-exposición al estrés osmótico (Grewal et al. 2006). Es por esto que el encapsulamiento recurre a esta propiedad (quietud) del nematodo para su supervivencia. Si bien cada uno de estos factores puede afectar la supervivencia de nematodos de forma independiente, es importante notar que en el pellet estos elementos interactúan entre sí.

Así como las características del suelo determinan la supervivencia y capacidad infectiva de los nematodos (Stock et al. 2003) debido a que la composición del mismo determina la retención de humedad, canales para el intercambio de oxígeno y de desplazamiento de los organismos, así también la estructura del pellet determina estas características al interior, de manera tal que debe ser adecuada para que los nematodos puedan adaptarse a estos nuevos regímenes de supervivencia. Se trata, entonces de aplicar principios de ingeniería para diseñar y construir un ambiente artificial adecuado para la supervivencia de los nematodos hasta su aplicación en campo, a esto lo podemos denominar ingeniería del pellet.

1.2 FORMULACIONES CON NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-034-FITO-1995, una formulación es la combinación de varios ingredientes para hacer que el producto sea útil y eficaz para la finalidad que se pretende.

Entre las formulaciones para almacenar y aplicar nematodos entomopatógenos (NE) en campo se encuentran: solución acuosa, gránulos (pellets), esponjas y cadáver. Un problema común entre ellas es la baja supervivencia de los NE durante su almacenamiento la cual es afectada por fenómenos físicos como la temperatura, falta de oxígeno, pérdida de humedad, pH del medio y radiación ultravioleta (Hazir et al. 2003).

Las formulaciones en solución acuosa han sido las más comúnmente utilizadas para la conservación y aplicación de nematodos entomopatógenos, mismas que han mostrado la mayor supervivencia, de 24 y hasta 36 meses (Chen y Glazer, 2005). Esto sucede siempre que se encuentren en refrigeración, requerimiento que eleva los costos y dificulta el transporte, además que hace necesario el uso de insumos y equipo de aplicación (Fife et al. 2003). Se han elaborado también formulaciones en esponjas de polieter poliuretano, las cuales han presentado una supervivencia de nematodos que oscila entre 1 y 3 meses almacenados a una temperatura de 5-10 °C (Grewal, 1998).

Del Valle et al. (2009) encapsularon cadáveres de larvas de la palomilla de la cera, *Galleria mellonella* L. (Lepidópteros: Pyralidos), con nematodos entomopatógenos en el interior, los almacenaron a 25 °C y los evaluaron después de 8 días, utilizaron tres diferentes materiales para el recubrimiento; carbonato de calcio con el que se observó una emergencia de 4,154 nematodos por cadáver, polvo para gelatina que tuvo una emergencia de 7,892 nematodos por cadáver y polvo de talco que fue el que presentó mejores resultados con 9,722 nematodos por cadáver. Los registros no muestran emergencia de nematodos después del día 8, además que los daños al cadáver por la manipulación durante el recubrimiento y la aplicación representan dificultades.

La formulación en gránulos (proceso conocido como pelletización o encapsulamiento) busca cumplir con las condiciones de inmovilidad, disminución del metabolismo, protección ante rayos UV y desecación gradual que se refleje en la disminución de consumo de energía y un incremento del tiempo de vida en almacenamiento de los nematodos (Grewal y Georgis, 1999). Aunado a esto se busca que el gránulo tenga un nivel de agregación y compactación que permita la disolución oportuna al contacto con la humedad.

Umamaheswari et al. (2006), elaboraron cápsulas de alginato de calcio conteniendo nematodos entomopatógenos *S. glaseri* en los que registraron una supervivencia de 77.5 por ciento en la semana 6, almacenados a 25°C.

A su vez Chen y Glazer (2005), también utilizaron las cápsulas de alginato de calcio para conservar nematodos de la especie *S. feltiae*, a los que sometieron a un tratamiento osmótico previo al proceso de encapsulamiento, una vez elaboradas las cápsulas, éstas se almacenaron a 23°C y humedad relativa (HR) de 100% con lo que lograron mantener una supervivencia de 99.8% al término de 6 meses.

Capinera y Hibbard (1987), iniciadores de esta formulación, elaboraron gránulos con harina de alfalfa en los que se obtuvo un tiempo de supervivencia de 7 días almacenados a 23 °C. El producto final fue invadido por hongos debido a las condiciones de humedad y materia orgánica favorables para su crecimiento. Con el fin de superar este problema, Connick et al. (1993) agregaron un 0.2% de formaldehído a la mezcla de bentonita, trigo glutinado y caolín con la que encapsularon los nematodos, que posteriormente sometieron a secado térmico. El calor para el secado de los gránulos causó afectación a la supervivencia de los nematodos y mayor dureza de los gránulos, impidiendo su solubilidad al contacto con la humedad y en consecuencia los nematodos no emergieron.

La dureza del gránulo fue analizada en el trabajo de Bedding (1991), quien elaboró gránulos con el mineral Atapulguita y los almacenó a 23 °C. Los nematodos sobrevivieron 4 semanas y los gránulos presentaron dificultad para disolverse.

En el estado de Oaxaca, Ruiz et al. (2003) realizaron experimentos semi controlados y de campo para determinar la efectividad de los nematodos en plántulas de maíz atacadas por gallina ciega *Phyllophaga vetula* Horn. Los resultados muestran que estos organismos entomopatógenos pueden ser buena opción para controlar la plaga pues no hubo diferencia significativa en el rendimiento al utilizar éstos y un plaguicida químico.

Posteriormente, Girón (2008) realizó estudios en laboratorio para determinar la especie, dosis letal 95 y tiempo letal 95 para causar la muerte en larvas de gallina ciega (*Phyllophaga vetula*). Los resultados obtenidos muestran que *Steinernema glaseri* es la especie de mayor efectividad para el control de gallina ciega, la dosis letal 95 es de 1035 nematodos por larva, causan la muerte en un tiempo de 16 días, partiendo de estos resultados, los organismos de esta especie fueron encapsulados de forma manual utilizando como material bentonita, se refrigeraron para conservarlos por más tiempo, sin embargo los registros muestran supervivencia solamente al día 4.

Alva (2002) concluyó que las características de los materiales granulares utilizados en el encapsulamiento como el tamaño de partícula, distribución de tamaño de partícula, grado de agregación, contenido de humedad y método de secado pueden determinar la dureza de un material sometido a procesos similares al encapsulamiento. Las arcillas como atapulguita, kieselguhr y tierras diatomeas han sido materiales recurrentes para encapsular, ya que al tener propiedades adsorbentes, propician la remoción del exceso de agua superficial, lo que provoca una deshidratación parcial de los nematodos (Bedding, 1991). De esta manera, Silver (1999) elaboró gránulos con arcilla pre gelatinizada, tierra diatomea y lignosulfato que fueron almacenados a 25 °C durante 6 semanas, al término de éstas el porcentaje de sobrevivencia mostraba un 76 %.

1.3 TÉCNICAS PARA CONSERVAR LAS FORMULACIONES

Entre las formulaciones desarrolladas hasta ahora destaca, la formulación acuosa, en ésta los nematodos pueden ser mantenidos en refrigeración y a temperatura ambiente, durante

cinco y un mes respectivamente, su baja efectividad y los altos costos debido a la refrigeración han limitado su uso, como fue el caso del producto Biosyst (Freidman, 1990).

Otra forma de almacenar los nematodos es mediante cadáveres de larvas infectadas, los nematodos son conservados en el interior hasta su aplicación, la dificultad que presenta esta formulación es la fragilidad de los cadáveres al manipularlos para el transporte y aplicación, esta formulación aun no ha sido comercializada (Alves, 2008).

Así mismo, los NE han sido almacenados y aplicados mediante la elaboración de gránulos (pellets) dispersables en agua, estos han sido elaborados tanto en gel como en materiales granulares (Soler et al. 2003). Los elaborados en gel han presentado supervivencia de nematodos hasta de 6 meses a temperatura ambiente, la dificultad que presentan es que se requieren de citrato de sodio para su disolución lo que aumenta los costos y dificulta su aplicación (Grewal y Georgis, 1999).

1.4 PROCESOS DE ELABORACIÓN DE PELLETS

En el CIIDIR-IPN Oaxaca, Girón (2008) encapsuló manualmente nematodos en una matriz de arcilla bentonita, presentando diversas desventajas como la poca uniformidad en forma y peso, lo que implica una dosificación desigual de nematodos en cada pellet, condiciones estructurales diferentes para cada unidad, además del bajo volumen de producción.

Tratando de evitar estas desventajas, Espinosa (2005) diseñó y construyó una máquina para mecanizar este proceso de encapsulamiento (pelletización) y aplicando la teoría de flujo de material granular en una estructura tronco-cónico propuso una alternativa para pelletizar nematodos en diversos materiales granulares. Dicha máquina realiza tres funciones principales: dosificación, formación y compactación del pellet (Figura 3).



Figura 3. Encapsuladora de nematodos: 1) Dosificador neumático de la solución acuosa conteniendo nematodos 2) Conos de alojamiento del material granular para la formación del pellet 3) Tornillo sinfín transportador-precompactador 4) Disco compactador.

La primera función, dosificación de la solución agua-nematodo, se realiza a través de una jeringa de 3 mL, cuyo émbolo es accionado con aire a presión, calibrado para originar una descarga de $200 \mu\text{L} \pm 5 \mu\text{L}$ de solución acuosa que contienen 1000 ± 50 nematodos.

La segunda función, la formación del pellet se realiza al caer una gota de la solución agua-nematodos en cada una de las 8 estructuras tronco-cónicas llenas de material granular y montadas en un soporte plano circular, posteriormente el flujo de material recubre la gota de la solución (Figura 4).

Este flujo es generado a través del cono truncado invertido, el cono es llenado por la parte superior que es el acceso de mayor diámetro y se mantiene tapada la salida que es el

orificio de menor diámetro, al liberarlo genera este flujo, creando una caída de material de las paredes hacia el centro del cono, siendo esto aprovechado para cubrir la gota depositada en su parte superior, al ser expuesta la gota a dicha corriente queda cubierta por material generando así una cápsula semiesférica (Pascual, 2006).



Figura 4. Patrón de recubrimiento de la gota de solución acuosa que contiene a los nematodos.

La tercera función se realiza por un sistema de transporte (tornillo sinfín) y la cuarta por un disco compactador. May (2008) y Matadamas et al. (2010) evaluaron esta parte del proceso y determinaron los parámetros de operación para estabilizar el tamaño y el peso de los pellets. Los resultados muestran que con una velocidad del sinfín transportador de 22 rpm, un ángulo de inclinación del disco compactador de 35.7° , una velocidad de 87 rpm y un tiempo de compactación de 90 s, fue posible obtener un coeficiente de esfericidad promedio de 87% y de homogeneidad en peso y volumen del 92%, con bentonita y arcilla fina como materiales granulares.

Estos resultados posibilitan continuar la experimentación en laboratorio a fin de evaluar otras características del pellet relacionadas con la dureza del mismo, el intercambio de oxígeno entre nematodo pelletizado y el ambiente, la solubilidad, la pérdida de humedad y el pH del pellet, así como protección de los nematodos contra rayos ultravioleta, entre otros.

Capítulo 2.

Marco Teórico

2. MARCO TEÓRICO

El marco teórico que ayudará a aproximar la explicación de los fenómenos involucrados en la supervivencia de nematodos encapsulados mecánicamente se presenta en esta sección.

2.1 DUREZA

Con base en la definición clásica de dureza como la capacidad de un cuerpo de resistirse a ser labrado, rayado, comprimido o desfigurado, es importante precisar que para esta investigación la dureza se conceptualiza desde dos enfoques de resistencia mecánica: 1) dureza como resistencia mecánica de la estructura del pellet a la acción de fuerzas normales de compresión y 2) dureza como la resistencia mecánica de la estructura del pellet a la acción físico-química de la humedad que tiende a debilitar los enlaces intermoleculares. Con el primero se busca comprender cómo la dureza de la matriz granular puede afectar la supervivencia de los nematodos al interior del pellet. Mientras que con el segundo enfoque se analiza el efecto de las condiciones de humedad en la liberación de los nematodos encapsulados al fallar la estructura del pellet. En el trabajo experimental de esta investigación se abordará el primer enfoque y concentrándose solo a la Resistencia Última a la Compresión del pellet.

2.2 EL ENSAYO A COMPRESIÓN

La prueba a compresión determina la magnitud de la fuerza normal requerida para hacer fallar la estructura mecánica de un pellet (Figura 5a). Dicha fuerza define la magnitud del esfuerzo, considerándolo como un cuerpo sólido cuyas deformaciones se pueden explicar con la teoría de resistencia de materiales clásica, la cual es una disciplina de la ingeniería mecánica y la ingeniería estructural que estudia los sólidos deformables mediante modelos simplificados.

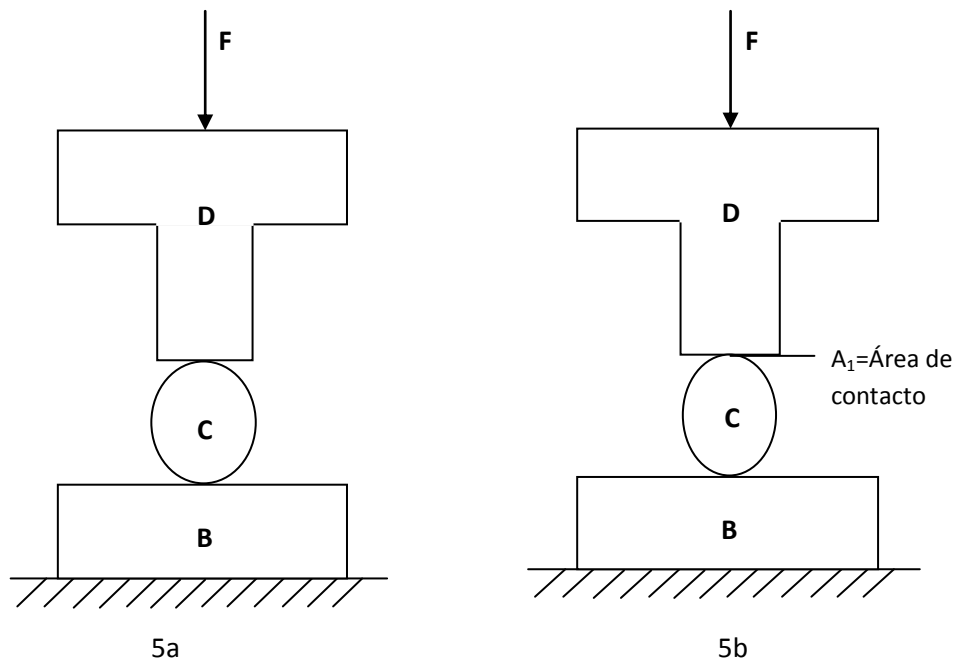


Figura 5. 5a Modelo del ensayo a compresión de un cuerpo esférico, 5b Modelo del ensayo a compresión de un pellet con 87 % de esfericidad.

Las particularidades de la forma del pellet en cuanto que no es totalmente esférico condiciona a que el contacto entre el cuerpo D y C se realice a través de un área que posibilita el cálculo del esfuerzo normal con el cociente entre la fuerza a compresión aplicada entre dicha área de contacto, $E=F/A$ (Figura 5b).

La relación entre el esfuerzo normal aplicado al pellet y su deformación correspondiente se puede presentar en un diagrama de esfuerzo-deformación unitaria (Figura 6):

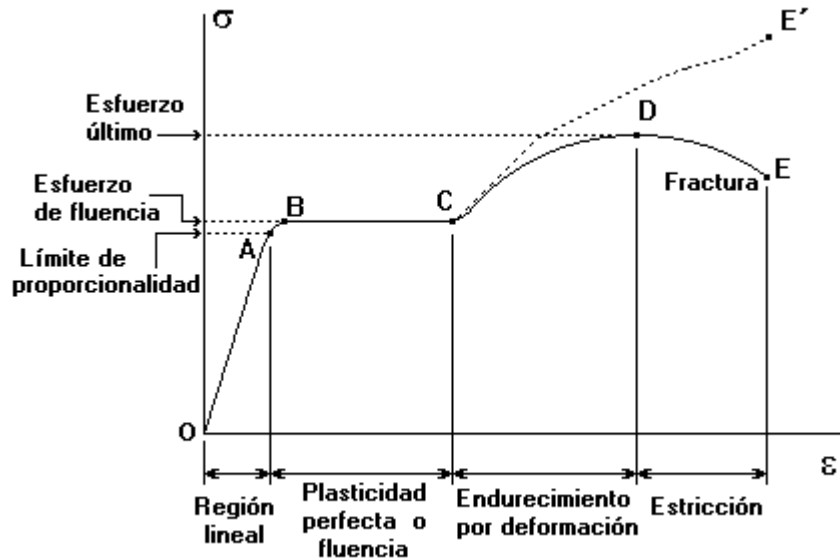


Figura 6. Diagrama característico de Esfuerzo-Deformación Unitaria de un cuerpo sólido.

Se denomina módulo de elasticidad a la razón entre el incremento de esfuerzo y el cambio correspondiente a la deformación unitaria. A compresión, este módulo se denomina módulo de Young, siendo una constante independiente del esfuerzo siempre que no exceda de un valor máximo denominado límite elástico o de proporcionalidad; tanto el módulo de Young como el límite elástico, son naturalmente distintos para los diversos materiales.

2.3 PROPIEDADES FÍSICAS DEL MATERIAL Y FORMACIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL PELLET

Las características físico-químicas del material granular son importantes para determinar la estructura que se formará al interior del pellet relacionadas con su resistencia mecánica a compresión y la pérdida de humedad del pellet.

Para el caso de los dos materiales granulares utilizados en esta investigación, tierra diatomea y atapulguita, esta información técnica aparece en el cuadro 1 y 2.

Cuadro 1. Propiedades físicas y químicas de la Tierra Diatomea, Celite 209

Datos técnicos	
Celite® 209	
Propiedades Físicas Típicas	
325 Mesh de residuos,	0,5%
% De absorción de aceite	175,0
Gravedad específica	2.10
pH Max.	7.0
% Humedad máx.	6.0
Superficie, B.E.T. m ² / g	10-20
d50, granulometría,	7.0 micrones
Análisis químico típico,% en peso	
H ₂ O	3.0
Pérdida de ignición	3.6
SiO ₂	86,7
Al ₂ O ₃	3,3
Fe ₂ O ₃	1,2
P ₂ O ₅	0,2
TiO ₂	0,2
CaO	0,5
MgO	0,5
Na ₂ O + K ₂ O	0,8

Cuadro 2. Propiedades físicas y químicas de la Atapulguita, Min U Gel 400

PROPIEDADES FÍSICAS	
Tamaño medio de partículas secas	4,2 micrones
-25 Micras de partículas (Alpine Air Sieve)	99,2%
Residuo de tamiz de malla 325	0,005%
Densidad Aparente / masa tamponada (lbs/ft ³)	28
--	--

Análisis químico típico
 SiO₂ 66.21% de MgO 9,70%
 Al₂O₃ 11,71% de K₂O 1,07%
 Fe₂O₃ 4,02% 2,57% de CO₂
 TiO₂ 0,55% 0,25% SO₄

P2O5 0,99% Otros 0,01%
Cao 2,92% Peso específico 2,40 g / ml

Capítulo 3.

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y METODOS

En el siguiente esquema se muestra la metodología realizada para la fase experimental de la presente investigación.

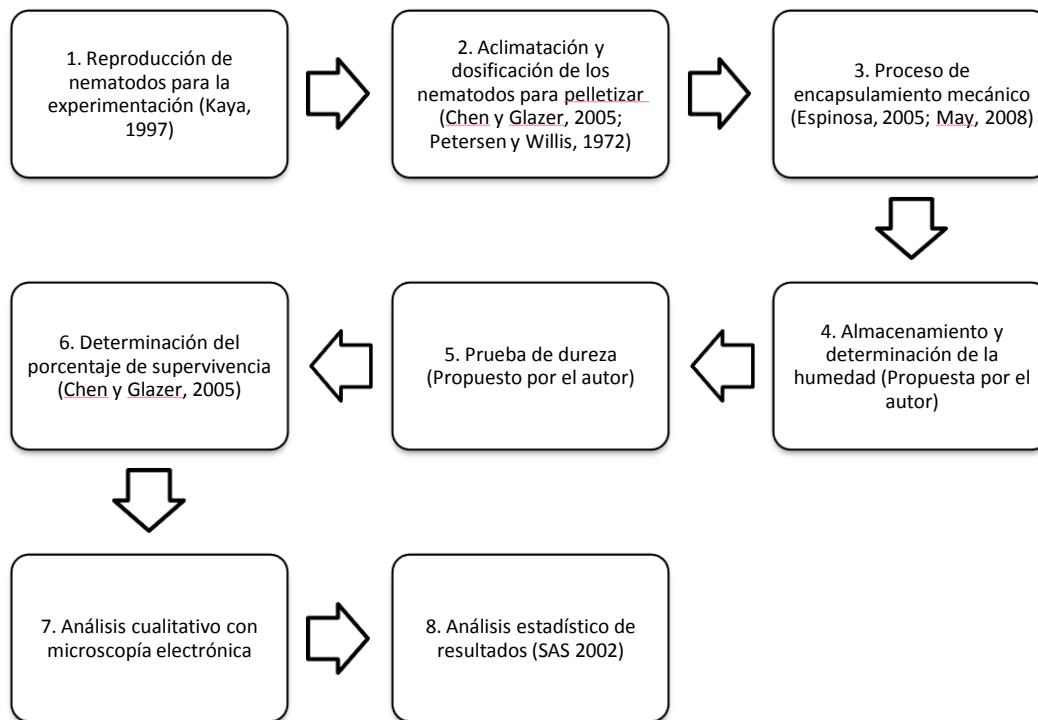


Figura 7. Metodología para la fase experimental

3.1 REPRODUCCIÓN DE NEMATODOS PARA LA EXPERIMENTACIÓN

El primer paso para realizar la experimentación fue contar con cantidad suficiente de organismos vivos (nematodos) para encapsular. Los nematodos utilizados son de la especie *Steinernema glaseri*, que se han mantenido con la reproducción y almacenamiento de los originalmente proporcionados por el Laboratorio de Nematodos Entomopatógenos de la Universidad de Davis California a cargo del Dr. H. Kaya (Girón, 2008).

El proceso para la reproducción de nematodos se efectuó en el Laboratorio de Control Biológico del CIIDIR IPN Unidad Oaxaca. La temperatura en este laboratorio es de $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 6^{\circ}\text{C}$, el hospedero utilizado para la reproducción de los nematodos fue la palomilla de la cera *Galleria mellonella* L. (Lepidópteros: Pyralidos), la obtención de los nematodos se dio

a través del método propuesto por Kaya y Stock (1997) modificado de acuerdo a la disponibilidad de los materiales experimentales.

Dicho método modificado es el siguiente: se colocaron larvas de *G. mellonella* en una caja de Petri de 5 cm rotulada con la especie y fecha de infestación, a la cual previamente se le colocó papel filtro con un gramaje de 80 g/m², un espesor de 0.170 mm y un tamaño de poro de 14-18 µm en el fondo.

Las larvas se sumergieron durante un tiempo de 15 s en agua caliente a 55 °C, después en agua a temperatura ambiente (15 °C) durante otros 15 s, y posteriormente se colocaron en cajas de Petri. Este tratamiento tiene la finalidad de evitar que ellas pupen además de disminuir su resistencia a la infestación. Enseguida, utilizando una micro pipeta, graduada a 20 µL se inocularon 200 nematodos ± 10 por larva, suspendidos en 600 µL ± 30 µL de agua bidestilada, con la finalidad de generar una humedad de 10 g/m³ en el papel filtro, facilitando con ello la movilidad de los nematodos y por consiguiente la infección de la larva.

Después de cinco días de infestadas las larvas, se pasaron a trampas White, es decir, a una caja de Petri (9 cm de diámetro) con 15 mL de agua bidestilada, en cuyo interior tienen colocada una caja de Petri de plástico de menor tamaño (2.5 cm de diámetro) con papel filtro encima, donde se colocaron las larvas infestadas, los nematodos al emerger de la larva se desplazan por el papel filtro húmedo y llegan al agua bidestilada de donde se colectan para almacenarse durante una semana.

El agua bidestilada utilizada como medio para conservar los nematodos, previo y durante el encapsulamiento, está libre de CO₂ y con un alto grado de esterilidad que evita causar un daño al nematodo durante su conservación (Chen y Glazer, 2005).

La temperatura de almacenamiento en refrigeración es de 6-8 °C. Después del almacenamiento a esta temperatura durante 1 semana, se sacaron para su encapsulamiento.

3.2 ACLIMATACIÓN Y DOSIFICACIÓN DE LOS NEMATODOS PARA PELLETIZAR

Los nematodos se aclimataron a $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h antes de ser pelletizados (Chen y Glazer, 2005). Debido a su reciente reproducción, todos los organismos contenidos en la solución, en el estado de Juveniles Infeccivos, se consideraron óptimos, por lo que fueron utilizados para el encapsulamiento sin someterlos a algún criterio de selección previo.

El paso siguiente fue lograr la concentración adecuada de nematodos en la solución, que permitiera hacer una dosificación precisa, de manera que se asegurara que por cada 200 μL de solución acuosa se tuvieran 1000 nematodos vivos ± 50 , para encapsular (Girón, 2008).

Para lograrlo, el método utilizado fue el de diluciones volumétricas (Petersen y Willis, 1972), que consiste en extraer cantidades de la solución y posterior a esto, tomar como mínimo cinco muestras para verificar la concentración resultante, por medio del cálculo de una proporción se estima la cantidad de organismos contenidos en una determinada cantidad de solución, dicha operación se repitió hasta lograr la concentración requerida (Girón, 2008).

Por la diferencia de peso entre los nematodos y la solución, éstos tienden a precipitarse, por lo que al momento de realizar la toma de muestra se agitó la solución de manera que la distribución de los nematodos fuera homogénea.

3.3 PROCESO DE ENCAPSULAMIENTO MECÁNICO.

Con la concentración de nematodos requerida en la solución, a la base de agua bidestilada se agregó 0.2% de formaldehído en los dos primeros experimentos, el cual cumple con las especificaciones de la Norma A.C.S. CAS 50-00-0 UN 1198. La finalidad de agregarlo a la solución acuosa es evitar el crecimiento de hongos al elaborarse el pellet, de acuerdo a lo citado por Connick et al. (1993), sin embargo en el último experimento se dejó de usar debido a que esta sustancia no está permitida en la agricultura orgánica de acuerdo a la norma NOM-037-FITO-1995.

Se agregó también a la mezcla 18% de glicerol, de acuerdo al método propuesto por Chen Y Glazer (2005). Debido a la capacidad higroscópica que presenta esta sustancia y poder mantener por más tiempo la humedad en el interior del pellet absorbiendo la mayor cantidad posible del ambiente.

Con el propósito de evitar la rápida pérdida de humedad se agregaron para pruebas separadas dos agentes espesantes: grenetina estándar y mucílago de nopal, en una sola dosis, debido a sus cualidades coagulantes, espesantes y de retención de humedad.

El material para encapsular los nematodos entomopatógenos fue tierra diatomea marca Celite grado 209, elaborado por Celite Corporation y Min-U-Gel grado 400 elaborado por Active Minerals. Las características físicas y químicas de los dos materiales, indicadas en las tablas 1 y 2, están aprobadas para encapsular organismos vivos (Silver, 1999; NOM-037-FITO-1995).

El proceso de encapsulamiento de los nematodos se realizó con el prototipo de máquina pelletizadora (Figura 3), desarrollada por Espinosa (2005), con los siguientes parámetros de operación: velocidad de rotación del disco compactador de 87 rpm, ángulo de inclinación del compactador de 35.7°; tiempo adecuado de permanencia del pellet en el disco 90 s, para obtener pellets con un coeficiente de esfericidad del 87.52 y un peso de 0.21447 g \pm 0.01 g (Matadamas et al. 2010).

3.4 ALMACENAMIENTO Y DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

El contenido de humedad en los pellets puede tener un efecto sustancial en las características del esfuerzo-deformación por lo que es medido mediante método gravimétrico durante todos los días de la prueba (Murase et al. 1980; Lin y Pitt, 1986).

Con el pellet terminado, se inició la etapa de almacenamiento para su conservación, la cual se realizó a temperatura ambiente 23 \pm 6°C y humedad relativa de 50-85 %. El contenido de humedad se evaluó a diario por el método gravimétrico, con el procedimiento que se detalla a continuación. Inmediatamente al salir el pellet de la máquina se pesó en una balanza

analítica marca Sartorius de precisión 0.001g con el fin de obtener el peso inicial, se repitió la operación registrando los valores diarios, la operación se realizó justo antes de diluir el pellet para el posterior conteo de nematodos, teniendo los datos del peso inicial y las mediciones diarias se calculó el contenido de humedad como el peso perdido del pellet durante el tiempo de secado según la siguiente ecuación 1:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

P_i = Peso inicial

P_f = Peso final

3.5 PRUEBA DE DUREZA.

La prueba de dureza se realizó a temperatura constante de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, bajo la norma ASAE S368.3 (1995) *Compresión Test of Food Materials of Convex Shape*, debido a que en la revisión bibliográfica no se encuentra una norma específica para los ensayos en pellets. El procedimiento establecido en dicha norma se adaptó para esta investigación como se describe a continuación.

El dispositivo de medición utilizado para determinar la magnitud de la dureza de los pellets se presenta en la figura 8. Está conformado de la siguiente manera: se montó una herramienta de compresión en el lente objetivo del microscopio estereoscópico y en la platina se colocó una base con un sensor piezoeléctrico integrado, siendo éste dispositivo el encargado de registrar la alteración en el voltaje al recibir una carga, el sensor se conectó a un equipo de cómputo con el software LabView, Signal Express (National Instruments Co.) para la adquisición de datos, la frecuencia de toma de datos fue de 1 milisegundo.

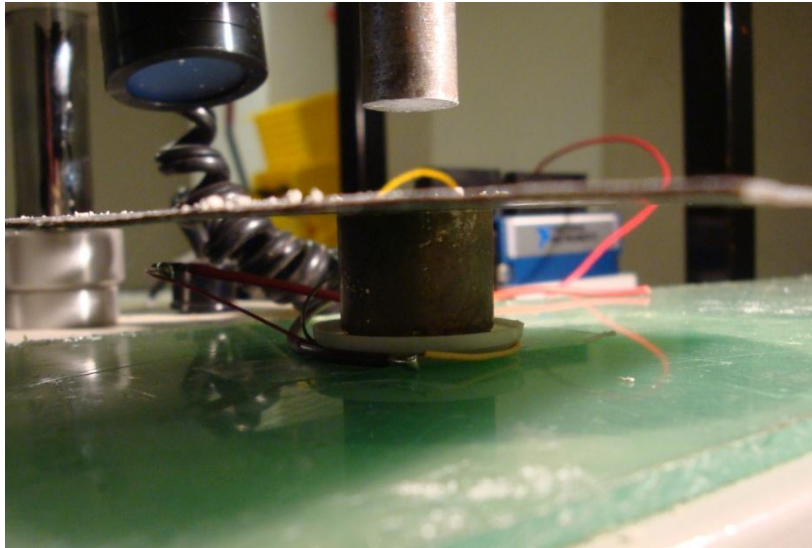


Figura 8. Dispositivo experimental para el ensayo de dureza en pellets con nematodos entomopatógenos.

La calibración del dispositivo se realizó mediante la medición de 5 pesos conocidos para obtener un voltaje, para cada prueba se realizaron 30 repeticiones (SAS, 2002).

Con los datos obtenidos en las pruebas de calibración se buscó el modelo que mejor representará la tendencia en el fenómeno físico. Resultando la ecuación (2), con un $r^2=0.94$.

$$y = \beta_0 e^{\beta_1 x} \quad \text{Ec. (2)}$$

Donde:

$$\beta_0 = 66.6633$$

$$\beta_1 = 0.2781$$

Al colocar la muestra a evaluar en el área del dispositivo designado para el ensayo a compresión, se tuvo cuidado de alinear el centro de la herramienta con el pico de la curvatura de la muestra (pellet) de ensayo.

3.6 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA DE LOS NEMATODOS.

Una vez terminada la prueba de dureza, un pellet del mismo bloque al evaluado, fue colocado en una caja Petri de 9 cm de diámetro y disuelto en 10 mL de agua bidestilada, con el fin de proveerle la humedad que requiere el nematodo para recobrar la movilidad, además de facilitar la visibilidad en el microscopio y realizar el conteo.

Basándose en el método propuesto por Chen y Glazer (2005), se realizó el conteo mediante el siguiente procedimiento: con la micropipeta se tomó una muestra de 200 μ L de la solución formada por el pellet disuelto y se llevó al microscopio estereoscópico para contar nematodos vivos y muertos; los vivos se identificaron porque presentan movilidad por sí mismos o al ser estimulados por una aguja. Una vez terminada la observación de la muestra, ésta es regresada a la solución madre y se repite la operación, se tomaron cinco muestras para cada pellet.

La supervivencia de los nematodos se examinó con un microscopio estereoscópico marca Olympus con apertura numérica de 0.2, resolución de 600 pares de líneas por milímetro y zoom de 30x. Los días de conteo fue la supervivencia crítica 50 de los organismos, es decir, hasta que los conteos registren un 50% de nematodos vivos.

3.7 ANÁLISIS CUALITATIVO CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Se realizó un análisis de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) en pellets enteros para conocer la superficie, y partidos por la mitad para conocer la estructura interna en interacción con los nematodos encapsulados. El principio de funcionamiento y la metodología para la prueba es la descrita por Stoog et al. (2002) y consiste en lo siguiente: la prueba se lleva a cabo mediante dos pares de bobinas localizadas entre las lentes del objetivo; uno de los pares desvía el haz en la dirección X hacia la muestra y el otro lo desvía en la dirección Y.

La imagen de la muestra se obtiene utilizando la salida de un detector que permite controlar la intensidad en un punto determinado con el Tubo de Rayos Catódicos (CRT). De este modo, este método de barrido produce un mapa de la muestra en el que hay una relación única entre la señal producida en una posición particular en la superficie de la muestra y el punto correspondiente de la pantalla de CRT. En contraste con otras formas de microscopía, en la de barrido de electrones no existe una imagen verdadera de la muestra. Toda la información sobre la muestra se obtiene directamente del mapa de superficie de la muestra.

Para la realización de la prueba se hace uso de soportes especiales de superficie circular donde se colocan las muestras del pellet, éstas deben estar convenientemente adheridas a dicho soporte, para ello se suele emplear una cinta de carbono (para hacerla conductora) con doble cara adhesiva. Si se utiliza otro tipo de adhesivo, éste debe ser: conductor, no gasificar en vacío, de fácil uso y rápido secado.

Una vez colocada la muestra, si no es conductora será necesario recubrirla con una capa conductora. Casi todas las muestras de materiales cerámicos y de polímeros suelen ser no conductoras, por lo que su observación con electrones secundarios es difícil. Sin embargo, en otros materiales cerámicos o vidrios, tales como: vidrios y vitrocerámicos de basalto, ferritas, arcillas o productos cerámicos tradicionales ricos en hierro, la conducción de la muestra es tal que su observación por SEM no requiere más que una buena adhesión entre la muestra y el porta muestras. En el caso de muestras en polvo se suele emplear cinta de doble cara adhesiva. La mayor parte de las muestras de materiales cerámicos son porosas o microporosas, por lo que se obtienen mejores resultados si se recubren con un equipo de “sputtering” (sistema con una cámara en la que se colocan una o varias muestras a la que se le hace vacío, para ello se emplea una bomba rotatoria). Las imágenes obtenidas se analizaron de forma cualitativa para su interpretación.

3.8 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS

Para el diseño experimental es importante mencionar que algunas variables que intervienen a lo largo de la prueba no están controladas como son temperatura, humedad relativa y

ventilación en el área de encapsulamiento de nematodos por lo que el efecto que puedan tener éstas sobre la variable respuesta se establecen como supuestos.

El primer experimento tuvo como objetivo contrastar el encapsulado mecánico (tratamientos) con el encapsulado manual (testigo) y mediante análisis de varianza (ANVA) y por comparación de medias por la prueba Tukey conocer si existe efecto del proceso mecánico en el porcentaje de supervivencia con un nivel de significancia del 95 %. Se probaron proporciones de materiales granulares de tierra diatomea y atapulguita con (100:0, 75:25, 50:50, 25:75 y 0:100) y tres niveles de ventilación (abierto, cerrado y semi-cerrado) durante el almacenamiento, por lo que se utilizó un diseño factorial 5x3 con 2 factores (proporciones de material granular y ventilación), el primero con 5 niveles y el segundo con 3 niveles, resultando 15 tratamientos, cada uno de ellos con 10 repeticiones dando un total de 150 unidades experimentales (Cuadro 3).

Cuadro 3. Diseño experimental para contrastar el encapsulamiento manual con el realizado de manera mecánica

Material (Tierra diatomea: atapulguita)	Nivel de Ventilación	Porcentaje de supervivencia (%)									
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
100:0	Abierto										
	Cerrado										
	Semi-cerrado										
75:25	Abierto										
	Cerrado										
	Semi-cerrado										
50:50	Abierto										
	Cerrado										
	Semi-cerrado										
25:75	Abierto										
	Cerrado										
	Semi-cerrado										
0:100	Abierto										
	Cerrado										
	Semi-cerrado										

%= La variable respuesta es el porcentaje de supervivencia de nematodos

En el segundo experimento con el que se evaluó el efecto de la adición de dos componentes en la solución sobre la supervivencia de los nematodos, se probaron dos proporciones de materiales granulares de tierra diatomea y atapulguita, (100:0 y 50:50), tres soluciones acuosas (agua bidestilada, mucílago de nopal y grenetina) en una sola dosis, las cuales sin y con recubrimiento superficial de aceite de girasol. Se utilizó un diseño factorial de 2x3x2 con tres factores (proporciones de material, soluciones acuosas, sin y con recubrimiento), el primero con 2 niveles, el segundo con 3 niveles y el tercero con 2 niveles, resultando 12 tratamientos, cada uno de ellos con 10 repeticiones, dando un total de 120 unidades experimentales. Los datos se analizaron por ANVA y comparación de medias con la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 95 % (Cuadro 4).

Cuadro 4. Diseño experimental para analizar el efecto de los componentes de la solución acuosa sobre el tiempo de supervivencia.

Material (Tierra diatomea: atapulguita)	Solución acuosa	Con o sin recubrimiento	Porcentaje de supervivencia (%)										
			Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	
100:0	Agua bidestilada	Sin											
		Con											
	Mucílago de nopal	Sin											
		Con											
	Grenetina	Sin											
		Con											
50:50	Agua bidestilada	Sin											
		Con											
	Mucílago de nopal	Sin											
		Con											
	Grenetina	Sin											
		Con											

%= La variable respuesta es el porcentaje de supervivencia de nematodos

En el tercer experimento se evaluó la supervivencia de los nematodos con cinco tratamientos, conteniendo diferentes proporciones de material, distintos componentes de la solución acuosa, con y sin recubrimiento; 1.- (100:0)-agua-con, 2.- (100:0)-mucílago-con, 3.- (100:0)-grenetina-sin, 4.- (50:50)-agua-con y 5.- (Testigo) (100:0)-agua-sin (Cuadro 5), con una significancia del 95 %, en este experimento además se determinaron las magnitudes de dureza originadas y el contenido de humedad en cada uno de los tratamientos.

Cuadro 5. Diseño experimental para analizar el efecto de los componentes de la solución acuosa y recubrimiento del pellet sobre el tiempo de supervivencia.

Material (Tierra diatomea: atapulguita)	Solución acuosa	Con o sin recubrimiento	Porcentaje de supervivencia (%)										
			Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	
100:0	Agua bidestilada	Con											
	Mucílago de nopal	Con											
	Grenetina	Sin											
50:50	Agua bidestilada	Con											
100:0 (Testigo)	Agua bidestilada	Sin											

%= La variable respuesta es el porcentaje de supervivencia de nematodos

Los datos se analizaron por ANOVA y comparación de medias con la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 95 %, además se aplicó un análisis factorial completo para determinar si existe correlación entre los factores, dureza, humedad y supervivencia.

Finalmente se realizó un análisis de Correlación Bivariada de Pearson para comprobar la influencia de la variable dureza del pellet en la supervivencia de nematodos y mediante un modelo matemático de predicción determinar el rango de dureza más conveniente para la elaboración masiva de pellets con nematodos entomopatógenos.

Capítulo 4.

Resultados y discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los datos de supervivencia, dureza y humedad obtenidos en los tres experimentos, todos son analizados estadísticamente mediante Análisis de Varianza (ANVA) y por comparación de medias por la prueba de Tukey, para el caso particular de las variables dureza y supervivencia se presenta un análisis de Correlación Bivariada de Pearson para determinar la influencia de la primera sobre la segunda, adicionalmente se calculó el rango de dureza de los pellets en el que se registró supervivencia de nematodos favorable. Por último se presentan y analizan imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido de la estructura interna de un pellet con nematodos entomopatógenos, con el propósito de complementar el análisis.

4.1 SUPERVIVENCIA DE NEMATODOS EN DOS MATERIALES GRANULARES Y TRES NIVELES DE VENTILACIÓN

Mediante la prueba de normalidad se determinó que los datos no siguen una distribución normal (SAS, 2002), esto debido a que la variable respuesta se midió en porcentajes. El análisis de varianza y la comparación de medias se hicieron con los datos reales y los resultados se muestran en unidades de porcentajes. El cuadro 6 muestra los porcentajes de supervivencia de nematodos obtenidos en cada día, de los pellets elaborados mediante el proceso mecánico de encapsulamiento.

Cuadro 6. Supervivencia de nematodos encapsulados mediante proceso mecánico.

Materiales (Tierra diatomea: atapulguita)	Nivel de ventilación	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
100:0	Abierto	100	0	0	0	0	0	0
	Cerrado	98.1	93.5	98.6	96.4	83.4	52.7	0
	Semi-cerrado	96.7	96.6	88.2	0	0	0	0
75:25	Abierto	0	0	0	0	0	0	0
	Cerrado	81.9	37.5	86	74.1	23.3	37.5	0
	Semi-cerrado	91.9	91.7	64.3	0	0	0	0
50:50	Abierto	0	0	0	0	0	0	0
	Cerrado	31.2	79.9	88.2	91.4	75.8	76.6	0
	Semi-cerrado	80.6	84.3	73.2	0	0	0	0
25:75	Abierto	0	0	0	0	0	0	0
	Cerrado	31.2	77.5	56.2	87.5	0	0	0
	Semi-cerrado	0	12.5	0	0	0	0	0

0:100	Abierto	0	0	0	0	0	0	0
	Cerrado	0	0	0	0	0	0	0
	Semi-cerrado	74.5	77.0	0	0	0	0	0

La figura 9 muestra la tendencia que presenta la supervivencia de nematodos, en los dos tratamientos que presentaron porcentajes superiores al 50% en el día 6.

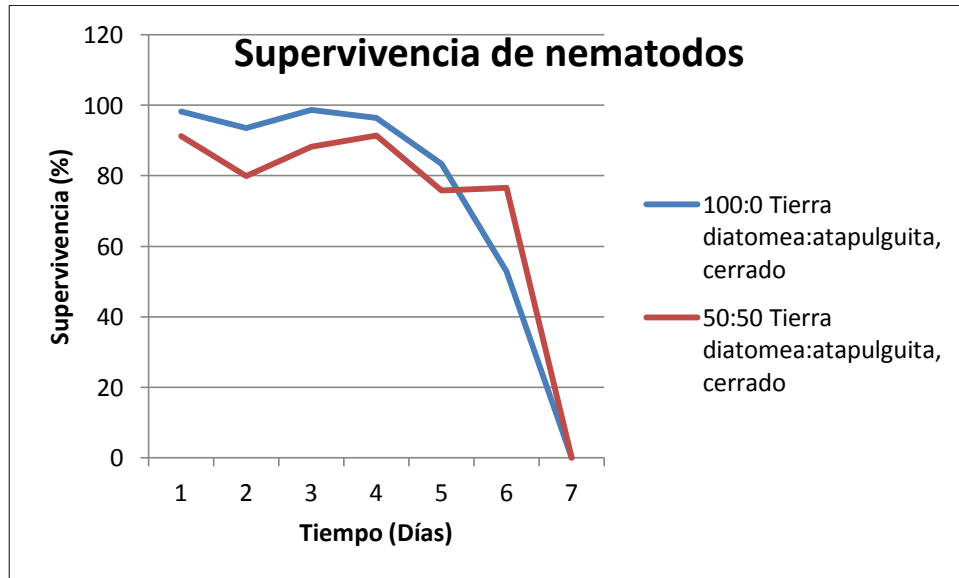


Figura 9. Supervivencia de nematodos encapsulados mediante proceso mecánico.

Para comparar el porcentaje de supervivencia de nematodos entre los tratamientos y probar si existen diferencias significativas se realizó un ANVA, los resultados mostraron que la diferencia es altamente significativa ($\alpha = 0.0001$), con un valor $F_{45}^{14} = 1.918$ y dado que $F_0 = 40.61 > 1.918$, se asegura que al menos un tratamiento tiene porcentaje de supervivencia diferente a los otros. Por lo que se realizó una comparación de medias por la prueba de Tukey. Los resultados se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Diferencias en la supervivencia de nematodos encapsulados mediante proceso mecánico, registradas al día 6.

Tratamiento	Material Tierra diatomea: atapulguita, Ventilación de los frascos	Media (% de supervivencia)	*
8	50:50, cerrados	76.60714	a
2	100:0, cerrados	52.77778	b
5	75:25, cerrados	37.50000	c

9	50:50, semi-cerrados	0	d
12	25:75, semi-cerrados	0	d
14	0:100, cerrados	0	d
11	25:75, cerrados	0	d
13	0:100, abiertos	0	d
1	100:0, abiertos	0	d
3	100:0, semi-cerrados	0	d
6	75:25, semi-cerrados	0	d
10	25:75, abiertos	0	d
15	0:100, semi-cerrados	0	d
4	75:25, abiertos	0	d
7	50:50, abiertos	0	d

*Los tratamientos con letra diferente son significativamente diferentes.

La prueba de Tukey muestra las diferencias estadísticas en el porcentaje de supervivencia de nematodos al día 6, resaltando el tratamiento elaborado con 50:50 Tierra diatomea: atapulguita y el elaborado con 100:0 Tierra diatomea:atapulguita, ambos con los frascos cerrados, que presentaron una supervivencia de nematodos vivos de 76.60 y 52.77%, respectivamente, ambos superan el 50% de supervivencia, porcentaje considerado factible para esta investigación. En el día 7 ningún tratamiento presentó supervivencia de nematodos.

Mediante el experimento se puede atribuir la mortalidad de nematodos a la rápida deshidratación de los pellets que estuvieron expuestos de forma continua a la ventilación, ya que los que se almacenaron completamente cerrados presentaron supervivencia por un mayor periodo de tiempo. De acuerdo a los resultados, serán estas dos proporciones de material granular y los frascos cerrados los que se utilizarán para el siguiente experimento.

4.2 SUPERVIVENCIA DE NEMATODOS EN DOS PROPORCIONES DE MATERIALES GRANULARES Y TRES COMPONENTES DE LA SOLUCIÓN ACUOSA.

Como en el caso anterior, en este segundo experimento se tomaron los datos reales de los porcentajes de supervivencia obtenidos, para la representación gráfica de la tendencia que siguen a través del tiempo, así como para el respectivo análisis estadístico. El Cuadro 8 muestra los porcentajes de supervivencia de nematodos obtenidos al variar los componentes de la solución acuosa, en dos proporciones de materiales granulares y aplicando un recubrimiento superficial.

Cuadro 8. Supervivencia de nematodos observada al variar los componentes de la solución acuosa, en dos proporciones de materiales granulares y aplicando un recubrimiento superficial.

Material (Tierra diatomea: atapulguita)	Solución acuosa	Con o sin recubrimiento	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9
100:0	Agua bidestilada	Sin	95.6	77.5	70.2	93.7	57.5	0	0	0	0
	Mucílago de nopal	Sin	100	100	96.4	90.8	94.7	6.2	0	0	0
	Grenetina	Sin	100	96.8	95.8	93.7	95.6	8.3	0	0	0
50:50	Agua bidestilada	Sin	96.4	95.8	95.8	91.6	79.1	0	0	0	0
	Mucílago de nopal	Sin	96.4	96.8	100	91.6	62.4	0	0	0	0
	Grenetina	Sin	100	100	95	100	93.7	0	0	0	0
100:0	Agua bidestilada	Con	100	93.3	94.3	88.7	87.4	95	0	0	0
	Mucílago de nopal	Con	100	100	100	99	95.8	91.6	87.5	78	0
	Grenetina	Con	100	97.2	100	100	83.3	0	0	0	0
50:50	Agua bidestilada	Con	96.4	95	93.7	93.7	33.3	25	0	0	0
	Mucílago de nopal	Con	100	100	100	93.7	70.8	0	0	0	0
	Grenetina	Con	100	100	95	91.6	95	91.6	50	0	0

La figura 10 muestra la tendencia de los porcentajes de supervivencia obtenidos con los diferentes tratamientos en función del tiempo.

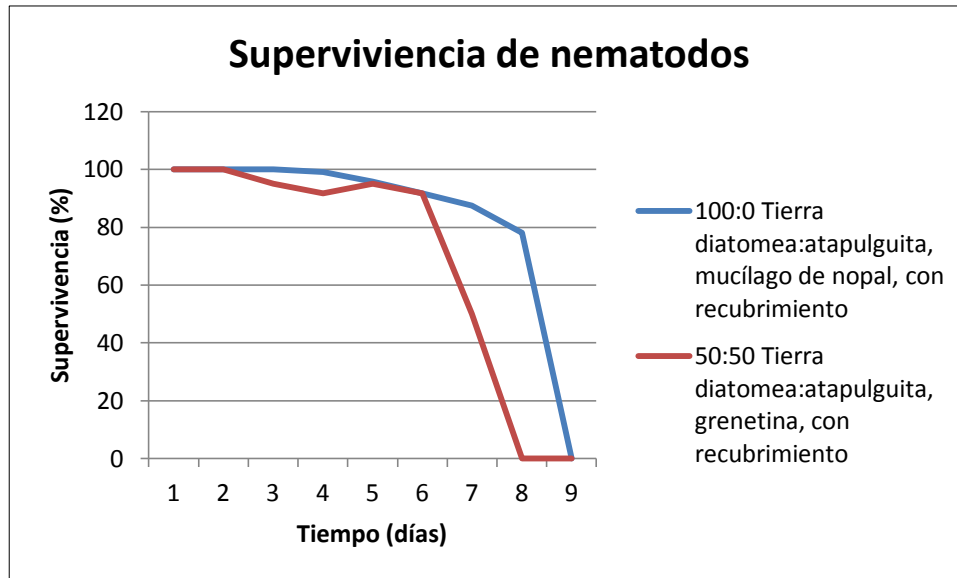


Figura 10 Supervivencia de nematodos observada al variar los componentes de la solución acuosa, en dos proporciones de materiales granulares y aplicando un recubrimiento superficial.

Para probar si existen diferencias significativas en la supervivencia media entre tratamientos se realizó un ANVA, los resultados mostraron que la diferencia es altamente significativa ($\alpha = 0.0001$), con un valor $F_{288}^{95} = 1.303$ y dado que $F_0 = 50.06 > 1.303$, se asegura que al menos un tratamiento tiene porcentaje de supervivencia media diferente a los otros. Por lo que se realizó una comparación de medias por la prueba de Tukey. Los resultados se muestran en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Diferencia en supervivencia media de nematodos observada al variar los componentes de la solución acuosa, en dos proporciones de materiales granulares y aplicando un recubrimiento superficial.

Tratamiento	Material Tierra diatomea:atapulguita, componentes de la solución, con o sin recubrimiento	Media (% de supervivencia)	*
T8	100:0, Mucílago, Con	94.009272	a
T12	50:50, Grenetina, Con	74.791667	b
T7	100:0, Agua Bidestilada, Con	69.858631	b c
T3	100:0, Grenetina, Sin	61.304451	c d
T6	50:50, Grenetina, Sin	61.093750	c d
T2	100:0, Mucílago, Sin	61.042907	c d

T9	100:0, Grenetina, Con	60.069444	c d
T11	50:50, Mucílago, Con	58.072917	d e
T4	50:50, Agua Bidestilada, Sin	57.366071	d e
T5	50:50, Mucílago, Sin	56.975446	d e
T10	50:50, Agua Bidestilada, Con	54.657738	d e
T1	100:0, Agua Bidestilada, Sin	49.333965	e

*Los tratamientos con letra diferente son significativamente diferentes.

Los resultados muestran que los pellets elaborados con 100:0 Tierra diatomea: atapulguita, con mucílago de nopal como sustrato y recubiertos con aceite de girasol, presentan la mayor supervivencia media con 94%, este tratamiento también fue el que presentó mayor tiempo de supervivencia que fue de 8 días, manteniendo un porcentaje al término de éstos de 78.03% de nematodos vivos, el mejor comparado con los demás tratamientos.

Al momento de la evaluación los nematodos presentaron alta movilidad, a pesar de que el núcleo del pellet presentó dificultades para disolverse, quedando grumos pequeños en la solución. Estos resultados permiten atribuir la variación de la supervivencia de nematodos a las diferentes proporciones de material y a la acción de retención de humedad que se buscó al incorporar el mucilago de nopal.

Debido a que en el experimento solo un tratamiento mostró supervivencia al día 8, entonces el criterio de selección de los tratamientos a utilizar en el siguiente experimento fue la supervivencia media, por lo que se eligieron los cuatro primeros tratamientos (T8, T12, T7, T3) que tuvieran un porcentaje de supervivencia media mayor a 50% y un testigo (100:0, Agua bidestilada, sin).

4.3 DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA ÚLTIMA A LA COMPRESIÓN (RUC) DE LOS PELLETS

Los tratamientos T8, T12, T7, T3 del experimento anterior se denominaron en el mismo orden T1, T2, T3, T4 más un testigo para el tercer experimento, el cuadro 10 resume las diferentes combinaciones.

Cuadro 10. Combinación de materiales y sustratos de la solución acuosa

Tratamiento	Material (Tierra diatomea: atapulguita)	Solución acuosa	Con o sin recubrimiento
1	100:0	Mucilago de nopal	Con
2	50:50	Grenetina	Con
3	100:0	Agua bidestilada	Con
4	100:0	Grenetina	Sin
Testigo	100:0	Agua bidestilada	Sin

Los resultados de la dureza definida por la Resistencia Última a la Compresión (RUC) que presentaron los pellets obtenidos de diferentes tratamientos en función de los días evaluados, se muestran en la figura 11.

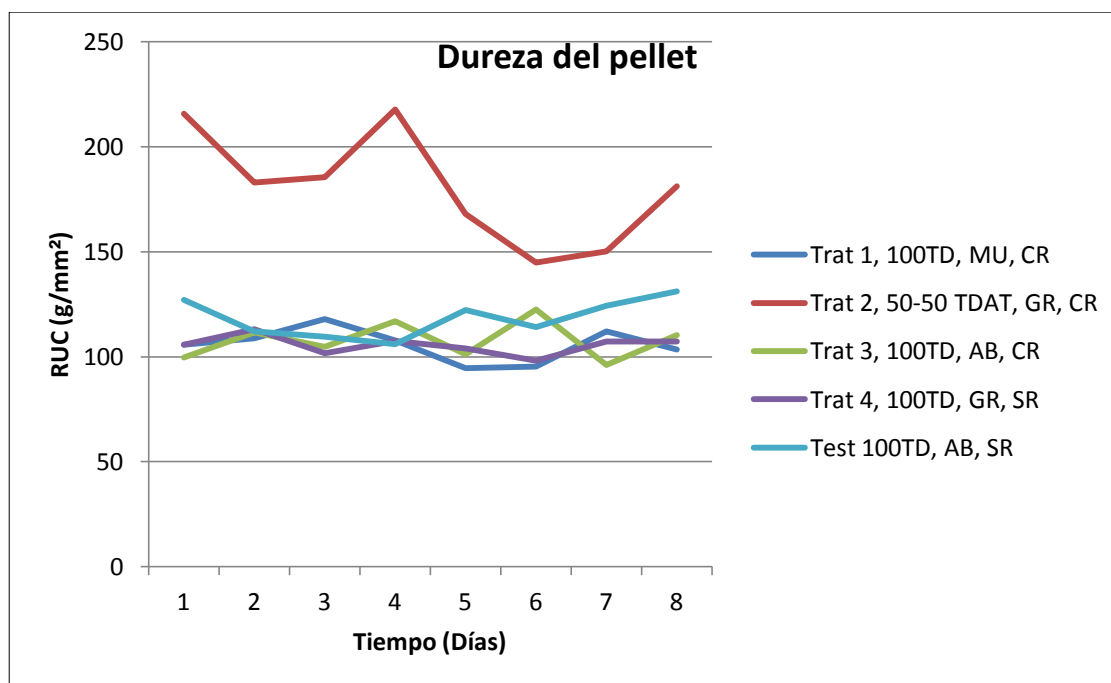


Figura 11.- Resistencia Última a la Compresión observada en pellets al variar los componentes de la solución acuosa, en dos proporciones de materiales granulares y aplicando un recubrimiento superficial.

Gráficamente se aprecia que el tratamiento 2 presenta una RUC mayor, cuestión que tiene que probarse estadísticamente, para lo cual se realizó un ANVA. Los resultados mostraron que la diferencia es altamente significativa ($\alpha = 0.0001$), con un valor $F_{34}^4 = 2.649$ y dado que $F_0 = 41.82 > 2.649$, se asegura que al menos un tratamiento tiene una RUC diferente a los otros. Por lo que se realizó una comparación de medias por la prueba de Tukey. Los resultados se muestran en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Diferencia en la RUC observada en pellets al variar los componentes de la solución acuosa, en dos proporciones de materiales granulares y aplicando un recubrimiento superficial.

Tratamiento	Componentes	RUC media	*
T2	50:50, Grenetina, Con	186.76136	a
Test	100:0, Agua Bidestilada, Sin	118.35287	b
T3	100:0, Agua Bidestilada, Con	108.60035	b
T1	100:0, Mucílago, Con	106.76143	b
T4	100:0, Grenetina, Sin	104.72439	b

*Los tratamientos con letra diferente son significativamente diferentes.

Los resultados de la prueba muestran que diferentes proporciones de material granular resultan en diferencias significativas en los niveles de dureza, se puede observar también que los componentes de la solución acuosa no determinan diferencias significativas en la dureza de los pellets, por lo que mediante el experimento se puede atribuir el incremento de la dureza del pellet a la incorporación del 50% de atapulguita a la mezcla, lo cual coincide con los resultados de Silver (1999) que demuestra que en mezclas que contienen un mayor porcentaje de atapulguita el tiempo de supervivencia fue menor.

4.4 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DE LOS PELLETS OBTENIDOS DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS

El contenido de humedad registrado en cada tratamiento, durante los días de evaluación se presentan en la siguiente figura.

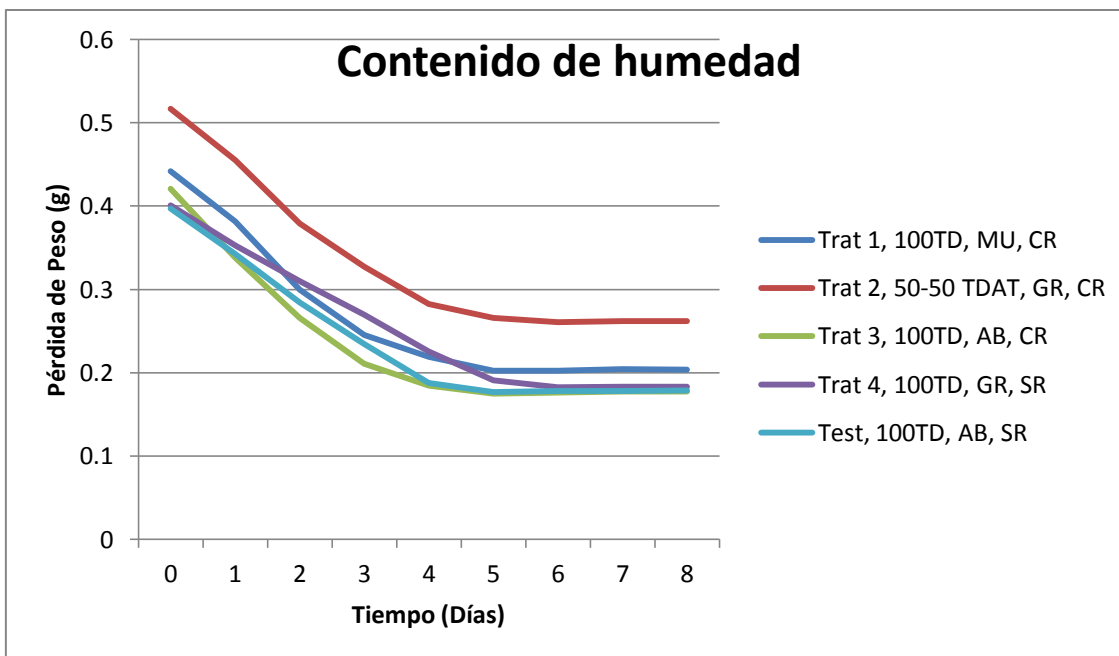


Figura 12.- Contenido de humedad observada en pellets al variar los componentes de la solución acuosa, en dos proporciones de materiales granulares y aplicando un recubrimiento superficial.

Para verificar si existen diferencias significativas en el contenido de humedad entre los tratamientos se realiza un ANVA. Los resultados mostraron que la diferencia es altamente significativa ($\alpha = 0.0001$), con un valor $F_{155}^4 = 2.430$ y dado que $F_0 = 7.73 > 2.430$, se asegura que al menos un tratamiento tiene un contenido de humedad diferente a los otros. Por lo que se realizó una comparación de medias por la prueba de Tukey. Los resultados se muestran en el cuadro 12.

Cuadro 12. Diferencia en el contenido de humedad observada en pellets al variar los componentes de la solución acuosa, en dos proporciones de materiales granulares y aplicando un recubrimiento superficial.

Tratamiento	Componentes	Contenido de humedad medio	*
T2	50:50, Grenetina, Con	0.30671875	a
T1	100:0, Mucílago, Con	0.24840625	b
T4	100:0, Grenetina, Sin	0.24125000	b
Test	100:0, Agua Bidestilada, Sin	0.21978125	b
T3	100:0, Agua Bidestilada, Con	0.20246875	b

*Los tratamientos con letra diferente son significativamente diferentes.

En los resultados se observa que las diferentes proporciones del material granular si tienen un efecto en la pérdida de peso atribuible a la humedad, observándose que esta pérdida es menor en el tratamiento 2, que está elaborado con el 50% de material atapulguita, por lo que se puede atribuir la acción de retener la humedad a este material, no así a los diferentes componentes de la solución acuosa, ya que estadísticamente se demuestra que estos no influyen significativamente en la variación del contenido de humedad de los pellets. A partir del día cinco el contenido de humedad en los pellets se mantiene constante.

4.5 ANÁLISIS PARA DETERMINAR LA CORRELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES DUREZA Y SUPERVIVENCIA

Para determinar la correlación entre las variables dureza del pellet y supervivencia de nematodos, se realizó un Análisis de Correlación Bivariada de Pearson. Los resultados se presentan en el cuadro 13.

Cuadro 13.- Análisis para determinar la correlación entre las variables dureza del pellet y supervivencia de nematodos.

Coeficientes de correlación Pearson, N = 160

Prob > |r| suponiendo H0: Rho=0

	DÍA	DUR	HUM	SUPER
DÍA	1.00000	-0.10406 0.1904	0.76270 <.0001	-0.69638 <.0001
DUR	-0.10406 0.1904	1.00000	-0.19714 0.0125	0.03738 0.6389
HUM	0.76270 <.0001	-0.19714 0.0125	1.00000	0.43636 0.0001
SUPER	-0.69638 <.0001	0.03738 0.6389	0.43636 0.0001	1.00000

Los resultados muestran que la columna de dureza y la hilera de día presentan un coeficiente correlación de -0.10406 y (Prob > |r|) >0.05, lo cual indica que el coeficiente de correlación es igual a cero y no existe correlación entre la dureza de los pellets y los días.

La columna de humedad y la hilera de día presentan un coeficiente correlación de 0.76270 y (Prob > |r|) <0.05, lo cual indica que el coeficiente de correlación es diferente de cero y existe correlación positiva entre la pérdida de peso atribuible a la humedad y los

días; a medida que los días aumentan la pérdida de peso atribuible a la humedad aumenta.

La columna de humedad y la hilera de dureza presentan un coeficiente correlación de -0.19714 y $(\text{Prob} > |r|) < 0.05$, lo cual indica que el coeficiente de correlación es diferente de cero y existe correlación negativa entre la pérdida de peso atribuible a la humedad y la dureza; a medida que la pérdida de peso atribuible a la humedad disminuye la dureza aumenta.

La columna de supervivencia y la hilera de día presentan un coeficiente correlación de -0.69638 y $(\text{Prob} > |r|) < 0.05$, lo cual indica que el coeficiente de correlación es diferente de cero y existe correlación negativa entre la supervivencia y los días; a medida que aumentan los días, la supervivencia disminuye.

La columna de supervivencia y la hilera de dureza presentan un coeficiente correlación de 0.03738 y $(\text{Prob} > |r|) > 0.05$, lo cual indica que el coeficiente de correlación es igual a cero y no existe correlación entre la supervivencia y la dureza.

La columna de supervivencia y la hilera de humedad presentan un coeficiente correlación de 0.43636 y $(\text{Prob} > |r|) < 0.05$, lo cual indica que el coeficiente de correlación es diferente de cero y existe correlación positiva entre la pérdida de peso atribuible a la humedad y la supervivencia; a medida que la pérdida de peso atribuible a la humedad aumenta la supervivencia aumenta.

4.6 RANGO DE DUREZA CALCULADO PARA MANTENER UNA SUPERVIVENCIA DE NEMATODOS DE 50 Y 95%

Aunque los resultados del análisis no consideran a la dureza como el factor determinante para causar la mortalidad de los nematodos encapsulados, resulta importante establecer los rangos de dureza mínimo y máximo en los que se obtuvieron porcentajes de supervivencia 50 y 95% al día ocho. Con ello se asegura que utilizando tierra diatomea (Celite 209), mucílago de nopal como componente de la solución acuosa y un recubrimiento superficial de aceite de girasol, siempre que el pellet se encuentre entre los rangos de dureza que se

muestran en el cuadro 14 se obtendrá un porcentaje de supervivencia de entre 50 y 95% de nematodos vivos al octavo día.

Cuadro 14. Rango mínimo y máximo de dureza recomendados para lograr la supervivencia de nematodos de 50 y 95% al día 8.

Supervivencia	RUC (g/mm ²)	Contenido de humedad
50%	121.25	56.22%
95%	82.51	48.48%

El modelo matemático de aproximación que rige el fenómeno es el siguiente:

$$\begin{aligned}
 \text{PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA (DÍA 8)} &= 136.168894611442 + (-21.955031341873) + (- \\
 &0.1769808435907) * DUREZA + (DUREZA-104.101327721875) * (-0.2395954174343) + (- \\
 &155.19955129449) * HUMEDAD + (HUMEDAD-0.24840625) * (-291.17477780601) + (DUREZA- \\
 &104.101327721875) * (HUMEDAD-0.24840625) * 6.29631000571392 + (DUREZA-104.101327721875) * \\
 &(HUMEDAD-0.24840625) * 12.0598586989168 \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad (Ec. 4)
 \end{aligned}$$

Con $r^2= 0.94$

4.7 SUPERVIVENCIA OBTENIDA AL VARIAR EL MATERIAL BIOLÓGICO EN EL PROCESO DE ENCAPSULAMIENTO MECÁNICO

Las diferentes combinaciones de materiales granulares y adición de componentes a la solución acuosa, dan como resultado una supervivencia de nematodos de 8 días como máximo, por lo que se optó, en un último experimento, por variar el material biológico, es decir, se utilizaron nematodos de edad menor, tenían solo tres días de colectados de la larva de *Galleria mellonella* cuando fueron encapsulados. Los resultados mostraron que el tratamiento compuesto de 100% tierra diatomea, agua bidestilada y encapsulado bajo el mismo proceso mecánico tuvo una supervivencia de 56 % en el día 15 después de ser encapsulados (Figura 13).

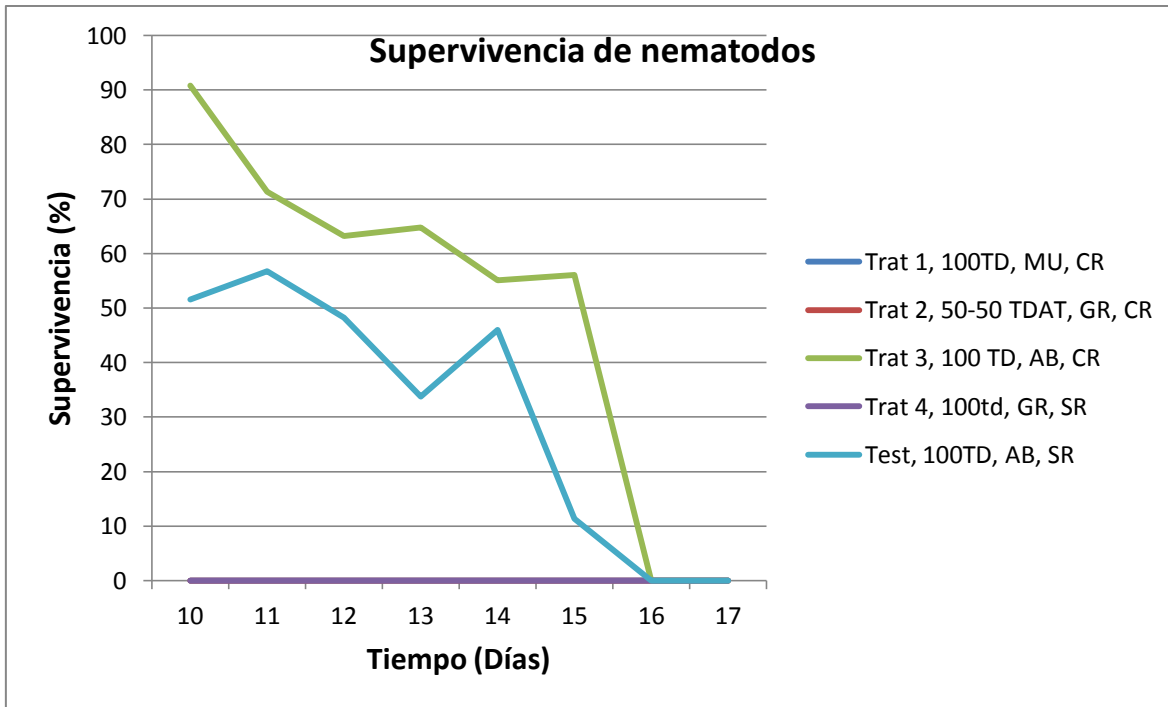


Figura 13 Supervivencia de 15 días de nematodos en pellets elaborados con organismos colectados a los tres días de emerger de la larva

Debido a que el contenido de los tratamientos fue el mismo en relación con las proporciones de material, los componentes de la solución acuosa, el recubrimiento superficial y el proceso de encapsulamiento, el resultado puede atribuirse a la edad de los nematodos encapsulados, siendo esta menor a la del experimento anterior. Otro factor a considerar son las condiciones no controladas durante la experimentación, como la humedad relativa, temperatura y los agentes contaminantes presentes en el ambiente. Variables que se recomienda analizar en futuras investigaciones.

4.8 ANÁLISIS CUALITATIVO DE MICROESTRUCTURA POR MEDIO DE SEM

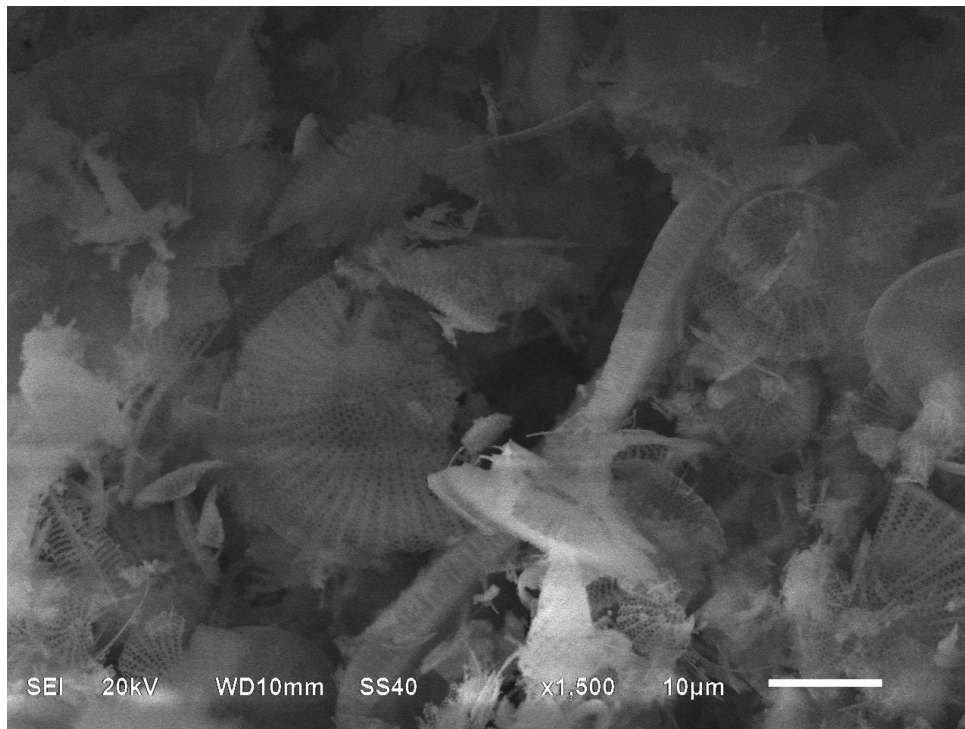


Figura 14. Imagen de partículas de tierra diatomea (CELITE 209) tomada por S.E.M voltaje acelerador 20 kV, magnificación 1500x

Mediante la imagen se puede observar que la estructura física del nematodo presenta mayor resistencia que la estructura interna del material granular, por lo que el nematodo toma su propia forma, no la determina el material. Mediante un muestreo basado en imágenes se puede ver también que partículas de tamaño promedio 25 μm favorecen la formación de espacios en el interior del pellet, estos espacios pueden limitar la retención de humedad en cantidades suficientes y dada la importancia de la humedad como factor para la supervivencia de nematodos (Barret, 1991), pueden ser estos causa de la mortalidad de los nematodos.

Otro hallazgo relevante obtenido de las imágenes es el tamaño de los nematodos encapsulados en las imágenes. Los nematodos observados en la imagen presentan un grosor de 5.56 μm y 50 μm de longitud, tamaño mucho menor al reportado en la literatura por García Del Pino (1996) que son mayores a 1000 μm , y por Nguyen (1995) que reporta 43 μm de grosor y 1130 μm de longitud.

Capítulo 5.

Conclusiones

CONCLUSIONES

Los resultados de la investigación obtenidos permiten concluir que el encapsulamiento mecánico no tiene un efecto en la supervivencia de los nematodos entomopatógenos *S. glaseri* ya que la supervivencia obtenida mediante el proceso mecanizado alcanzó 8 días, duplicando la supervivencia de cuatro registrada en pellets elaborados manualmente.

Al variar las proporciones de los materiales granulares para el encapsulado mecánico se presenta una variación en la dureza de los pellets, se demostró también que los componentes de la solución acuosa no alteraron la dureza, aun así pudo comprobarse que la variable dureza no tiene un efecto determinante en la supervivencia de nematodos encapsulados.

Siempre y cuando se trabaje con pellets con un rango de dureza entre 121.25 y 82.51 g/mm² puede obtenerse un porcentaje de supervivencia mínimo de 50 y máximo de 95% al octavo día de elaborados, bajo los mismos parámetros del proceso mecánico y materiales utilizados en la presente investigación.

Al demostrarse que la dureza de los pellets elaborados mecánicamente no tiene un efecto en la supervivencia de nematodos entomopatógenos se rechaza la hipótesis planteada al inicio de la investigación y se puede concluir que el proceso mecánico utilizado y los rangos de dureza de los pellets obtenidos son adecuados para la producción masiva de este tipo de bioplaguicida.

BIBLIOGRAFÍA

- Alatorre, R. R. (1997). Perspectiva del uso de nematodos entomopatógenos en México. En: H. C. Arredondo-Bernal, J. Molina-Ochoa y V. M. Velásquez-Hernández (Eds.), *Potencial de Nematodos Entomopatógenos en el Control de Plagas* (pp. 72-78). México: Universidad de Colima- Colegio de Posgraduados.
- Altieri, M. A., Trujillo, J., Campos, L., Klein-Koch, C., Gold, C. S., & Quezada, J. R. (1989). El control biológico clásico en América Latina en su contexto histórico. *Manejo Integrado de Plagas*, 12, 82-107.
- Alva, N., 2002. Evaluación del cambio de formulación y mejora del Procedimiento de fabricación de tabletas de Hioscina –N- Butil bromuro de 10 mg. Tesis de Licenciatura. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.
- Arredondo B. H. C., & Hernández, V. M. (2002). Sinopsis: situación actual del control biológico de plagas en México. En: *XIII Memoria del Curso Nacional de Control Biológico* (pp. 175-186). México: Sociedad Mexicana de Control Biológico.
- ASAE S368.3 MAR95. Compression Test of Food Materials of Convex Shape.
- Barrera, J. F. (2007). Introducción, filosofía y alcance del control biológico. En: L. A. Rodríguez-del-Bosque & H. C. Arredondo-Bernal (Eds.), *Teoría y Aplicación del Control Biológico* (pp. 1-18). México: Sociedad Mexicana de Control Biológico.
- Barrera, J. F., Infante, F., De la Rosa, W., Castillo, A., & Gómez, J. (2000). Control biológico de la broca del café. En: M.H. Badii, A.E. Flores & L. J. Galán W. (Eds.), *Fundamentos y perspectivas de control biológico* (pp. 211-229). México: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Barrett, J. 1991. Anhydrobiotic nematodes. *Agricultural Zoology Reviews* 4, 161–176.
- Bernal, J. S., & Quezada, J. R. (1999). Perspectivas y desafíos para el control biológico en México. *Vedalia*, 6, 3-14.
- Bolognesi, C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research*, 543, 251-272.
- Bolognesi, C., & Morasso, G. (2000). Genotoxicity of pesticides: potential risk for consumers. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 182-187.
- Bukingham, E.A. 1907. Studies on the Movement of Soil Moisture. US Dep.. Agr. Bull, 38.

- Burnell, A. M., & Stock, P. (2000). *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts lethal pathogens of insects. *Nematology*, 2 (1), 31-42.
- Capinera, J.L. y B.E. Hibbard. 1987. Bait formulations of chemical and microbial insecticides for suppression of crop-feeding grasshoppers. *Journal of Agricultural Entomology* 4: 337-344.
- Chen, S. y I. Glazer. 2005. A novel method for long-term storage of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* at room temperature. *Biological Control* 32, pp. 104–110.
- Cohen, P. 1989. The ASME handbook on Water Technology for Thermal Power Systems. The American Society of Mechanical Engineers (Eds), p. 442.
- Connick, W.J., Nickle, W.R. y Vinyard, B.J. 1993. “Pesta”: New granular formulations for *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Nematology*. 25 (2): 198-203.
- Espinosa R. M. 2005. Diseño de una máquina para encapsular nematodos Entomopatógenos. Tesis de Ingeniero Mecánico Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. 115 p.
- FAO. 2006. Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias. Roma.
- Filippone, S., Heimanna, F. y Rassat, A. (2002). A highly water-soluble 2+1 b-cyclodextrin–fullerene conjugate». *Chem. Commun.* pp. 1508–1509.
- Frederikse, H.P.R. y D. R. Lide. (Eds). (n.d.). *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. ISBN 0-8493-0478-4.
- García Del Pino, F. (1996). Los nematodos entomopatógenos, agentes de control de plagas. En: J. Jacas, P. Caballero & J. Avila (Eds.), *Morfología del nematodo: control biológico de plagas y enfermedades* (pp. 87-114). Castelló de la Plana: Publicaciones de la Universitat Jaume.
- Girón, P. S. (2008). *Evaluación de dos formulaciones de nematodos entomopatógenos para el control de gallina ciega (Phyllophaga vetula) en maíz*. Tesis de Maestría. IPN CIIDIR-Oaxaca. México.
- Glaser, R. W. & Fox, H. (1930). A nematode parasite of Japanese beetle (*Popillia japonica* Newm.). *Science* 70:16-17.
- Glaser, R. W. (1932). Studies on *Neoaplectana glaseri*, a nematode parasite of Japanese beetle (*Popillia japonica*). New Jersey Department of Agriculture, Circular No. 211.
- Greathead, D. J., & Waage, J. K. (1983). Opportunities for biological control of agricultural pests in developing countries. *World Bank Technical Paper Number 11*, (44 p.), Washington, D.C., USA: The World Bank.

- Grewal, P.S. (2002). Formulation and application technology. In: R. Gaugler (Ed.), *Entomopathogenic Nematology* (pp. 265–287). Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Grewal, P.S., & Georgis, R. (1999). Entomopathogenic nematodes. In: F. R. Hall & J. Menn (Eds.) *Methods in biotechnology. Vol. 5: Biopesticides: Use and delivery.* (pp. 271-299). Totowa, N.J., USA: Humana Press.
- Grewal, P.S., Susan Bornstein-Forst, S., Burnell, A.M., Glazer, I. y Jagdale, G. B. 2006. Physiological, genetic, and molecular mechanisms of chemoreception, thermobiosis, and anhydrobiosis in entomopathogenic nematodes. *Biological Control* 38, 54–65.
- Hazir, S., Kaya, H. K., Stock, S. P., & Keskin, N. (2003). Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. *Turkish Journal of Biology*, 27, 181-202.
- Hernández, R. J. y Quinto, D. P. 2005. Secado de medios porosos: una revisión a las teorías actualmente en uso. *Científica*, 9 (2).
- Hill, J.W. y Petrucci, R. H. 1999. General Chemistry, 2nd edition, Prentice Hall.
- Kaya, H. K. y S. P. Stock. 1997. Techniques in insect nematology. In: Manual of Techniques in Insect Pathology. L. A. Lacey (ed) Academic Press, London. pp. 281-324.
- L. A. Rodríguez-del-Bosque & H. C. Arredondo-Bernal (Eds.), *Teoría y Aplicación del Control Biológico* (pp. 1-18). México: Sociedad Mexicana de Control Biológico.
- Liedo, P., & Cancino, J. (2000). Control biológico de moscas de la fruta. En: M.H. Badii, A.E. Flores & L. J. Galán W. (Eds.), *Fundamentos y perspectivas de control biológico* (pp. 231-242). México: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Linus, P. 1970. General Chemistry. Dover Publishing. p 450
- Martínez P. A., Plaguicida Biológico a base de quitosano. España. (Cl. ES. 01/00429), 10 Noviembre 2000, P. 200002708. 28 p.
- Matadamas O. P. T., May C. A. A. y Mendoza P. M. 2010. Experimentos para la elaboración mecanizada de bioplaguicidas agrícolas en forma de pellets hidrosolubles con nematodos entomopatógenos. Memorias del XII CNCA. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- May C. A. 2009. Compactación mecánica de pellets. Informe de Residencia Profesional. Universidad Autónoma Chapingo – IPN CIIDIR Oaxaca. México. 34 p.
- Nekrasov, I.Y. 1996. Geochemistry, Mineralogy and Genesis of Gold Deposits. Taylor & Francis (Eds.), pp.135-136.

- Nguyen, K. B. and G. C. Smart, Jr. 1995. Scanning electron microscope studies of *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae). *Nematologica* 41:183-190
- Nickle, W.R., Drea, J.J., & Coulson, J.R. (1988). Guidelines for introducing beneficial insect-parasitic nematodes into the United States. *Annals of Applied Nematology*, 2, 50-56.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-034-FITO-1995, Por la que se establecen los requisitos y especificaciones fitosanitarias para el aviso de inicio de funcionamiento que deberán cumplir las personas físicas o morales interesadas en la fabricación, formulación, formulación por maquila, formulación y/o maquila e importación de plaguicidas agrícolas. Diario Oficial de la Federación del 27 de septiembre de 1995
- NORMA Oficial Mexicana NOM-037-FITO-1995, Por la que se establecen las especificaciones del proceso de producción y procesamiento de productos agrícolas orgánicos. Diario Oficial de la Federación del 23 de abril de 1997.
- Pascual R. G. A. 2006. Apoyo en diseño y construcción de un mecanismo dosificador a precisión para prototipo de una máquina encapsuladora de nematodos entomopatógenos. Informe Final de Residencia Profesional. ITO-CIIDIR IPN Oaxaca. México.
- Peng, J. H., & Black, L. L. (1976). Increased proteinase inhibitor activity in response to infection of resistant tomato plants by *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 66, 958-963.
- Petersen, J. J. and Willis, O. R. 1972. Procedures for the mass rearing of a mermithid parasite of mosquitoes. *Mosquitoes News* 32, (2), 226 – 230.
- Ruiz V. J., Sánchez G. J. A. y Arce G. F. 2008. Control de plagas agrícolas. In Matadamas O.P.T. (Ed.) *Investigación en Oaxaca. Compendio a inicios del siglo XXI*. CIIDIR. Oaxaca. IPN. 108 p.
- Ruiz, V. J., & Bolaños, A. T. (2003). Control biológico de gallina ciega *Phyllophaga vetula* Horn (Meloidae) bajo condiciones semicontroladas y de campo. In: A. Aragón, M.A. Morón & A. Marín (Eds.), *Estudios sobre Coleópteros del suelo en América* (pp. 299-331). México: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- SAGARPA. 2010. Síntesis del Sector Agropecuario de Oaxaca. Dirección General de Estudios Agropecuarios y Pesqueros. México. Consultado el día 17 de enero de 2011 en: http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Estadisticas/Documents/OAXACA.pdf?Mobile=1&Source=%2Fagronegocios%2FEstadisticas%2F_layouts%2Fmobile%2Fview.aspx%3FL

ist%3Dea4191c6-15b5-4625-afe9-be7e6cce2216%26View%3Df5c8d175-3fb9-49f2-86e6-c9db05b29bfb%26CurrentPage%3D1

- Sarukhán, J. (2007, Junio). *Una visión ecológica sobre la ética ambiental*. Conferencia presentada en la Facultad de Filosofía y Letras, UNAM. Obtenido de: <http://www.dialogos.unam.mx/una%20vision%20ecologica%20de%20la%20etica%20ambiental.pdf>
- Silver, S. C. 1999. Granular formulation of biological entities with improved storage stability, E. U. 5, 965, 149. (Cl. A01N 25/28 A01N 25/00), 12 October 1999. Appl. 08/284, 072, 14 Feb. 1994, 14 pp.
- Simmonds, F. J., Franz, J. M., & Sailer, R. I. (1976). History of biological control, In: C.B. Huffaker & P.S. Messenger (Eds.), *Theory and practice of biological control* (pp. 17-39). New York, USA: Academic Press.
- Soler, D., Gómez, I., & Sánchez, I. (2003). Formulación de nematodos entomopatógenos. *Protección Vegetal*, 18 (1), 7-14.
- Stock, S. P., & Camino, N. B. (1996). Nematodos entomopatógenos. En: R. Lecuona (Ed.), *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga* (pp. 105-118). Buenos Aires, Argentina: Talleres Gráficos Mariano Mas.
- Trujillo, J. (1991). Metodología del control biológico. En: L.A. Rodríguez del Bosque & R. Alatorre (Eds.), *Memorias del II Curso de Control Biológico, SMCB-UAAAN* (pp. 43-46). Saltillo, Coahuila, México.
- Van Driesche, R. G., & Bellows, T.S. (1996). *Biological control*. New York, USA: Chapman & Hall
- Wharton, D.A., 2003. The environmental physiology of Antarctic terrestrial nematodes: a review. *Journal Comparative Physiol. Biochem. B* 173, 621–628.
- Wilson, F., & Huffaker, C. B. (1976). The philosophy, scope, and importance of biological control. In: C.B. Huffaker & P.S. Messenger (Eds.), *Theory and practice of biological control* (pp. 3-15). New York, USA: Academic Press.