

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 disgregación mecánica y nivel de rehidratación del pellet en la emergencia de nematodos entomopatógenos *Steinernema glaseri* encapsulados mecánicamente”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta

VÍCTOR ALBERTO FRANCO LUJÁN

Directores de tesis

Dr. Juan Alejandro Vázquez Feijoo
Dr. Jaime Ruiz Vega

Santa Cruz, Xoxocotlan, Oaxaca, Junio 2015



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 21 del mes de mayo del 2015 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 disgregación mecánica y nivel de rehidratación del pellet en la emergencia de nematodos entomopatógenos *Steinernema glaseri* encapsulados mecánicamente

Presentada por el alumno:

Franco

Apellido paterno

Lujan

materno

Víctor Alberto

nombre(s)

Con registro:

A	1	3	0	0	0	6
---	---	---	---	---	---	---

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. Juan Alejandro Vazquez Feijoo

Dr. Jaime Ruiz Vega

Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez

Dr. Teodulfo Aquino Bolaños

Dr. Víctor Guillermo Jiménez Quero

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. José Rodolfo Martínez y Cárdenas
Encargado de la Dirección





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 21 del mes mayo del año 2015, el (la) que suscribe Franco Lujan Víctor Alberto, alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro A130006, 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 Drs. Juan Alejandro Vázquez Feijoo y Jaime Ruiz Vega y cede los derechos del trabajo titulado: "Efecto de la disgregación mecánica y nivel de rehidratación del pellet en la emergencia de nematodos entomopatógenos *Steinernema glaseri* encapsulados 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 francolujan_89@hotmail.com Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



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

Víctor Alberto Franco Lujan

RESUMEN

Los bioplaguicidas granulares (pellets) con nematodos entomopatógenos (NEP) han demostrado ser una alternativa viable para el almacenamiento y supervivencia de los NEP, sin embargo un inconveniente es la liberación de los NEP del pellet. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la disgregación mecánica (DM) y nivel de rehidratación (NR) del pellet en la emergencia de NEP *Steinernema glaseri* encapsulados mecánicamente. Para la DM se evaluaron cuatro energías de disgregación (0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 m). El NR del pellet se realizó mediante cinco tiempos de permanencia en una cámara nebulizadora de 50x50x50 cm, determinando así mismo su capacidad de absorción (CA) máxima de agua y la evaluación de su cohesión microestructural (τ) en función de su NR. La emergencia de los NEP fue evaluada mediante un diseño experimental de dos factores (DM y NR) y las pruebas de infectividad y patogenicidad se realizaron con larvas del último instar de *Galleria Mellonella* y del tercer estadio de *Phyllophaga spp.* Los resultados mostraron que el pellet necesita un NR mínima de 326.2 ± 13.66 mL de agua para su disgregación, teniendo una CA máxima de agua del 90.90%. Las energía de DM de 0.2 y 0.4 m no provocaron una DM significativa del pellet, pero las energía de 0.6 y 0.8 m fueron capaces de lograr una DM. La τ del pellet sin rehidratar fue 0.75 g/mm^2 la cual se incrementa con forme se rehidrata, alcanzando una τ máxima de 0.81 g/mm^2 y disminuye con forme se sigue rehidratando hasta llegar una τ de 0.45 g/mm^2 . La máxima emergencia de los NEP sólo por el factor NR fue de 876 NEP. La interacción de un NR del 50% y una DM de 0.6 m provocó una emergencia de 1016 NEP equivalentes al 100%. La prueba de infectividad demostró que la DM y NR del pellet no tienen efecto negativo sobre la infectividad de los NEP logrando una infectividad y patogenicidad máximas del 95% y 20% respectivamente, ambas con el tratamiento de DM de 0.6 m y un NR del 50%. El bajo porcentaje de patogenicidad puede ser atribuido a la pérdida de virulencia de los NEP al ser constantemente reproducidos en larvas de *Galleria mellonella*.

Palabras clave: Disgregación. Liberación. Pellets. Rehidratación. *Steinernema glaseri*.

ABSTRACT

Granular bioplagicides (pellets) with entomopathogenic nematodes (EPN) have shown to be a viable alternative for storage and survival of EPN, however one drawback is the release of the EPN from the pellet. The objective was to evaluate the effect of mechanical disintegration (MD) and level of rehydration (LR) of the pellet in the emergence of EPN *Steinernema glaseri* mechanically encapsulated. The degree of MD of four energies was evaluated (0.2, 0.4, 0.6 and 0.8 m). The pellet's LR was completed in five residence times in a spray chamber of 50x50x50 cm, also determining the absorption capacity (AC) and the evaluation of the microstructural cohesion (γC) according to their LR. The emergence of the EPN was evaluated using an experimental design of two factors (MD and LR) and infectivity and pathogenicity test were performed with last instar larvae of *Galleria Mellonella* and third stage larvae of *Phyllophaga spp.* The results showed that the pellets need a minimum LR of 326.2 ± 13.66 mL of water for their dispersion, having a maximum AC of 90.90%. The MD energy generated at 0.2 and 0.4 m did not cause a significant effect, but the energy at 0.6 and 0.8 m was able to achieve a MD. The pellet without rehydration had a $\gamma C = 0.75$ g / mm² which increased with rehydration to reach a maximum γC of 0.81 g/mm² but afterwards, even with continuous rehydration, decreased to $\gamma C = 0.45$ g/mm². The maximum emergence of EPN associated to the LR factor only was 876 EPN on average. The infectivity test demonstrated that MD and LR of the pellet have no negative effect on infectivity of EPN, achieving maximum infectivity and pathogenicity of 95% and 20% respectively, both with treatment MD = 0.6 m and LR = 50 %. The low percentage of pathogenicity can be attributed to the loss of virulence of EPN which was constantly reproduced in larvae of *Galleria Mellonella*.

Keywords: Disaggregation. Pellets. Rehydration, Release, *Steinernema glaseri*.

DEDICATORIA

A mi familia:

A mis padres Victor y Estela y mi hermana Melissa que gracias a su cariño, guía y apoyo he logrado realizar uno más de los anhelos de mi vida: fruto del inmenso apoyo, amor y confianza que en mi depositaron y con los cuales he logrado terminar una etapa de mi vida profesional, que constituye el legado más grande que puedo recibir y por lo cual les viviré eternamente agradecido.

A mis tíos y primos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Programa Institucional de Formación de Investigadores del IPN por el apoyo económico recibido durante mis estudios de posgrado.

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

A mi consejero de estudios y director de tesis, Dr. Juan Alejandro Vázquez Feijoo por compartir sus conocimientos y experiencias, por su guía, confianza y respeto durante la mis estudios de maestría en ciencias.

Al Dr. Jaime Ruiz Vega, director de tesis por compartir sus conocimientos, sus atinadas sugerencias y correcciones.

Al honorable comité tutorial y comisión revisora de tesis: Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez, Dr. Teodulfo Aquino Bolaños y el Dr. Víctor Guillermo Jiménez Quero, por enriquecer esta tesis con sus comentarios y recomendaciones.

Al Dr. Pastor Teodoro Matadamas Ortiz por su asesoría en los primeros semestres, así mismo por la madurez que logro forjar en mí.

A los profesores-investigadores de la Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales.

A los M. C. Carlos Inocencio Cortes Martínez y Heriberto Cruz Martínez por su apoyo en la introducción y comprensión del tema de tesis

Al M. C. José Antonio Navarro por su apoyo operativo y logístico

A mis compañeros y amigos de la maestría, Miguel, José Antonio, Edwin, Stefania, Elia, Alicia.

CONTENIDO

Resumen	i
Abstract.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos	iv
Indice de tablas.....	vii
Indice de figuras	viii
CAPÍTULO 1. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	1
1.1 INTRODUCCIÓN	2
1.2 PROBLEMA TÉCNICO DE LA INVESTIGACIÓN	9
1.3 JUSTIFICACIÓN	9
1.4 HIPÓTESIS	10
1.5 OBJETIVOS	10
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO	11
2.1 ENSAYO DE CIZALLADURA	12
2.2 ESTABILIDAD Y FALLA ESTRUCTURAL.....	13
2.3 MIGRACIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS.....	14
2.4 DISGREGACIÓN POR REHIDRATACIÓN DEL PELLET.....	14
2.5 DISGREGACIÓN MECÁNICA DEL PELLET	15
2.6 EMERGENCIA DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS.....	16
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 REPRODUCCIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS <i>Steinernema glaseri</i>	19
3.2 ENCAPSULAMIENTO MECÁNICO DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS <i>Steinernema glaseri</i>	19
3.3 PRUEBA DE DISGREGACIÓN POR REHIDRATACIÓN DEL PELLET.....	20
3.4 CAPACIDAD DE ABSORCIÓN MÁXIMA DE AGUA DEL PELLET.....	21
3.5 EFECTO DE LA REHIDRATACIÓN EN LA COHESIÓN MICROESTRUCTURAL DEL PELLET.....	22
3.6 DISGREGACIÓN MECÁNICA DEL PELLET.....	23
3.7 EMERGENCIA DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS <i>Steinernema glaseri</i>	24

3.8 EVALUACIÓN DE LA INFECTIVIDAD Y PATOGENICIDAD DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS <i>Steinernema glaseri</i>	24
3.9 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	24
3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
CAPÍTULO 4. RESULTADOS.....	28
4.1 DISGREGACIÓN POR REHIDRATACIÓN DEL PELLET.	29
4.2 CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE MÁXIMA DE AGUA DEL PELLET.....	31
4.3 EFECTO DE LA REHIDRATACIÓN EN LA COHESIÓN MICROESTRUCTURAL DEL PELLET.....	32
4.4 DISGREGACIÓN MECÁNICA DEL PELLET.....	34
4.5 EMERGENCIA DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS <i>Steinernema glaseri</i>	36
4.6 EFECTO DE LA DISGREGACIÓN MECÁNICA Y REHIDRATACIÓN DEL PELLET EN LA INFECTIVIDAD Y PATOGENICIDAD DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS <i>Steinernema glaseri</i>	38
CAPITULO 5. DISCUSIÓN	41
5.1 DISGREGACIÓN POR REHIDRATACIÓN DEL PELLET.	42
5.2 CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DEL PELLET	42
5.3 COHESIÓN MICROESTRUCTURAL DEL PELLET.....	43
5.4 DISGREGACIÓN MECÁNICA DEL PELLET.....	44
5.5 EMERGENCIA DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS <i>Steinernema glaseri</i>	45
5.6 INFECTIVIDAD Y PATOGENICIDAD DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS <i>Steinernema glaseri</i>	46
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	47
REFERENCIAS	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Investigaciones sobre bioplaguicidas agrícolas con NEP en el CIIDIR-Oaxaca.	7
Tabla 2. Diseño experimental de la disgregación por rehidratación del pellet.	25
Tabla 3. Diseño experimental del efecto de la rehidratación en la cohesión microestructural del pellet.	26
Tabla 4. Diseño experimental de la energía de impacto para disgregación mecánica del pellet.	26
Tabla 5. Diseño experimental del efecto de la disgregación mecánica y rehidratación del pellet en la emergencia de los NEP <i>S. glaseri</i>	27
Tabla 6. Comportamiento de la masa y μL de agua absorbidos por el pellet.	29
Tabla 7. Análisis estadístico de los resultados de la disgregación por rehidratación del pellet.	29
Tabla 8. Resultados de la masa inicial y final de los pellets empleados para determinar la CA máxima de agua.	31
Tabla 9. Resultados de la cohesión microestructural del pellet.	32
Tabla 10. Diferencia en la cohesión media de los pellets al ser rehidratados en la cámara nebulizadora.	33
Tabla 11. Diferencia entre las relaciones de disgregación granular medias de los pellets al ser disgregados mecánicamente.	35
Tabla 12. Número de NEP <i>S. glaseri</i> emergidos de los tratamientos disgregación mecánica y rehidratación del pellet.	36
Tabla 13. Análisis de varianza realizado al diseño experimental de emergencia de NEP.	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida del nematodo entomopatógeno <i>Steinernema spp</i> y <i>Heterorhabditis spp</i>	4
Figura 2. Agregado granular de material arcilloso, solución acuosa y nematodos entomopatógenos.	6
Figura 3. Celda de corte de acuerdo a la norma ASTM D6128-00: (1) anillo de corte inferior, (2) anillo de corte superior, (3) tapa de la celda de corte, (4) soporte, (5) perno, (6) percha, (7) pesas.	12
Figura 4. Celda de Jenike utilizada para pruebas de corte directo en materiales granulares.....	13
Figura 5. Película de agua "film" rodeando partículas de arcilla.....	15
Figura 6. Proceso para la evaluación del efecto de la disgregación mecánica y por rehidratación del pellet en la emergencia de los NEP <i>Steinernema glaseri</i>	18
Figura 7. Máquina pelletizadora de NEP: 1) Dosificador neumático de la solución agua-NEP, (2) conos de alojamiento del material granular, (3) tornillo sinfín transportador-precompactador y (4) disco compactador.	20
Figura 8. Cámara nebulizadora utilizada para rehidratar pellets: (1) Balanza de precisión, (2) anillo metálico soportador del pellet.....	21
Figura 9. Plano inclinado para determinar la fuerza de cohesión del pellet: (1) Dado inferior fijo, (2) dado superior móvil, (3) inclinómetro.....	22
Figura 10. Gráfica del comportamiento de la masa del pellet en función del T_p en la cámara nebulizadora.	30
Figura 11. Gráfica del comportamiento de la masa del pellet vs μL de agua absorbidos.	31
Figura 12. Gráfica del comportamiento de la $^{\circ}\text{C}$ del pellet en los 4 T_p en la cámara nebulizadora.	33
Figura 13. Gráfica del comportamiento de la $^{\circ}\text{C}$ vs μl de agua absorbidos.	34
Figura 14. Relación de supervivencia granular en función de la energía de disgregación del pellet.	35
Figura 15. Gráfica de los efectos principales vs emergencia de los NEP <i>S. glaseri</i>	37

Figura 16. Grafica de la interacción entre la energía de disgregación mecánica y rehidratación del pellet en la emergencia de los NEP *S. glaseri*. 38

Figura 17. Porcentaje de infectividad de los NEP *S. glaseri* emergidos del pellet vs larvas del último instar de *Galleria mellonella*. 39

Figura 18. Porcentaje de mortalidad de los NEP *S. glaseri* emergidos del pellet vs larvas del tercer estadio de *Phyllophaga spp.* 40

CAPÍTULO 1

PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN

La exigencia de cultivos con rendimientos cada vez mayores, el incremento de las utilidades de la producción agrícola y las previsiones de una producción insuficiente de alimentos para satisfacer la demanda mundial, han encaminado al uso indiscriminado, no selectivo y excesivo de plaguicidas para el control de plagas (Dhaliwal et al, 2010), que no solo se caracterizan por una alta toxicidad para las especies plagas, sino que también pueden ser tóxicos, a un grado distinto, para el medio ambiente y otras especies, incluyendo a los seres humanos (Bolognesi 2003; Bolognesi y Merlo 2011). La exposición humana a los pesticidas puede ocurrir directamente en el uso profesional, la agricultura y en los hogares, e indirectamente a través de la dieta, ya que los pesticidas en el suelo pueden ser absorbidos por las raíces de las plantas y ser trasladados a otros tejidos vegetales, incluyendo la fruta (Bolognesi y Merlo, 2011) dando lugar a efectos agudos y retardados.

Los problemas ambientales asociados al uso de pesticidas como consecuencia de su persistencia en el tiempo, y la no biodegradación ocasiona que se acumulen en el suelo, donde se filtran hacia las aguas subterráneas contaminándolas, así como la descarga masiva, y la concentración de compuestos tóxicos en el ambiente natural van creando mecanismos de adaptación en insectos, malezas o bacterias, aumentando la resistencia de las plagas, mitigando la población de los organismos no objetivo, es decir, la reducción de insectos benéficos (Davis, 1993), y favoreciendo la proliferación de plagas secundarias.

El uso de productos químicos llamado también (i) control tradicional, es solo uno de tantas variedades de métodos que existen para el control de plaga, dentro de los cuales se encuentran: (ii) el control mecánico que comprende las técnicas más antiguas y simples de la lucha contra los insectos, consisten en atrapar manualmente a la plaga y ponerle barreras o trampas, interrumpir su reproducción usando aspiradoras y arando la tierra, la aplicación de estas técnicas demanda mucha mano de obra por lo que tienden a desaparecer de las grandes y medianas áreas de cultivo; (iii) el control

génico o legal que consiste en esterilizar un gran número de insectos para que se apareen con los insectos-plaga, así esta ve reducida o perdida su capacidad de reproducción, otra técnica de este método es la introducción de plantas transgénicas con propiedades insecticidas (Bernal y Quezada, 1999) resistentes a plagas, este método ha tenido grandes avances en la lucha contra las plagas, pero no siempre ha sido un éxito total, en muchos casos los insectos, hongos o bacterias evolucionan rápidamente y pueden volver a convertirse en plaga de la variedad que era resistente; (iv) el control cultural ejecuta acciones como la rotación de cultivos interrumpiendo el ciclo de vida de muchas plagas. En Estados Unidos de América la información meteorológica también se utiliza para predecir la actividad de estas, o bien la modificación de las fechas de siembras y cosechas, todas estas técnicas no afectan al medio ambiente y a los seres humanos pero no son efectivas a la hora de controlar las plagas.

Por último y no menos importante método es el (v) control biológico, De Bach (1964) lo define como la acción de parasitoides, entomopatógenos y depredadores para controlar la población de plagas, dentro de sus ventajas se encuentra: la nula resistencia de las plagas al agente del control biológico, no existen problemas con intoxicaciones, y la relación costo/beneficio es muy favorable ya que según Del Rincón (2012) en términos económicos los beneficios del control biológico han sido espectaculares, estimándose que por cada dólar que se invierte en control biológico de una plaga se ganan treinta, mientras que con el uso de químicos la relación se reduce de 5 a 1. El control biológico hace uso de amplia gama de organismos para el control de insectos, entre los que 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).

Los nematodos entomopatógenos (NEP) representan un grupo de invertebrados no segmentados, de la clase *Secernentea*, del orden *Rhabditida*, familia *Steinernatidae* que cuenta con tres géneros *Steinernema spp.*, *Heterorhabditis spp.*, y *Neosteinerema*

(San-Blas, 2012) contando con un aparato excretor, sistema nervioso, aparato reproductor y sistema muscular (Martínez, 2000). Los NEP del genero *Steinernema spp.*, son portadores de la bacteria *Xenorhabdus* que es liberada una vez que el NEP entra al organismo del insecto plaga por alguno de sus orificios naturales y es causante de su muerte debido a una grave infección (Burnell y Stock, 2000). Una vez realizada dicha función y agotada la energía del cadáver, los NEP de la tercera generación llamados infectivos juveniles (IJ) son los que se diseminan a otros organismos y repiten el ciclo (Stock y Camino, 1996) (Figura 1).

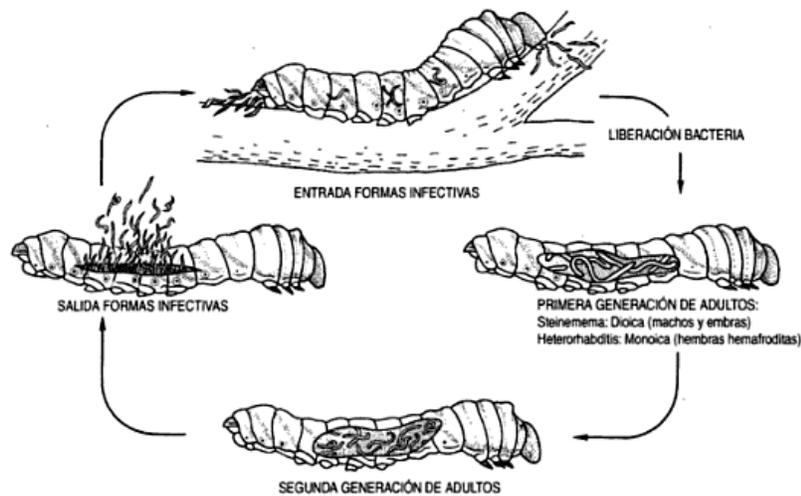


Figura 1. Ciclo de vida del nematodo entomopatógeno *Steinernema spp* y *Heterorhabditis spp*.

Dentro del género *Steinernema spp.*, García del Pino (1996) reporta la existencia de 33 especies de NEP, de las cuales, cuatro son de interés comercial: *S. feltiae*, *S. carpocapsae*, *S. riobravis* y *S. glaseri*. De estas especies *Steinernema glaseri*, descubierta por Glaser y Fox (1930), es la que posee formas infectivas de mayor tamaño y alta movilidad lo que incrementa su comportamiento intensivo de búsqueda de huéspedes en capas inferiores del suelo (García del Pino, 1996), además está exenta de registro por la agencia de protección del medio ambiente de los Estados Unidos (EPA), ya que está comprobado que no representa riesgo para el ser humano o al medio ambiente (Peng y Black, 1976; Nickle et al, 1998), lo que lo hace excelente candidato para la formulación de bioplaguicidas. Sin embargo el uso de los NEP no se ha podido generalizar como un control de plagas agrícolas debido a los altos costos y

diversas limitantes para su reproducción masiva así como la baja supervivencia en condiciones de almacenamiento (Grewal, 2002), transportación, la competencia con plaguicidas químicos ya establecidos y la falta de evaluaciones en campo. Es por eso que diversas formulaciones de NEP han sido desarrolladas con la finalidad de conservarlos por periodos de tiempo más amplios. Aunque el concepto general de las formulaciones de NEP es similar a las formulaciones de plaguicidas tradicionales, los NEP presentan desafíos únicos, requerimientos de humedad, oxígeno y la sensibilidad a temperaturas extremas, y el comportamiento de los juveniles infectivos limitan la elección del método de formulación y los ingredientes.

Los principales objetivos del desarrollo de formulaciones de NEP incluyen el mantenimiento de la calidad de estos, la mejora de la estabilidad de almacenamiento, la facilidad y reducción de los costos de transporte, así como la mejora de la supervivencia de NEP durante y después de la aplicación. Dentro de las formulaciones desarrolladas se encuentran: (i) esponjas que conservan una alta viabilidad pero no pueden ser envasados en altas densidades y están limitados en su adecuación a gran escala; (ii) soluciones acuosas aplicadas por sistemas de irrigación o spray (Shapiro-Ilan et al, 2006), con la necesidad de conservarlos a bajas temperaturas para su almacenamiento; (iii) la formulación en cadáveres que consiste en la supresión de la plaga por los NEP que emergen de estos, pero para evitar la ruptura o se adhieran entre sí, los cadáveres se recubren con una formulación de protección (Shapiro-Ilan et al, 2003), o en insectos de cuerpo duro (Shapiro-Ilan, 2006).

Un avance en la tecnología de formulación fue el desarrollo de gránulos dispersables en agua (WG) como geles, polvos y agregados de material granular, como una protección ante los factores abióticos del medio ambiente como son los rayos UV, la humedad ambiental y la temperatura. En los WG los NEP entran en un estado parcialmente anhidrobiótico permitiéndoles sobrevivir hasta seis meses en temperaturas de 4 a 25 °C (Grewal, 2000a). Las formulaciones granulares llamados pellets ofrecen varias ventajas entre las que se incluyen: (i) la estabilidad prolongada de almacenamiento a temperatura ambiente del NEP, (ii) una mayor tolerancia a

temperaturas extremas de los NEP permitiendo que su transporte sea más fácil y menos costoso, (iii) la mejora de la facilidad de uso de NEP por el tiempo y la eliminación de los pasos de preparación de trabajo intensivo, (iv) disminución del tamaño del recipiente y la relación de cobertura, (v) la disminución de la eliminación de material es decir, pantallas y recipientes, y una apariencia más aceptable. Esta es la primera formulación comercial habilitada para *S. carpocapsae* con un tiempo de almacenamiento de más de seis meses a 25 ° C (Grewal, 2000a).

En el CIIDIR – Oaxaca se encuentra en desarrollo el encapsulamiento mecánico conocido también como pelletización de NEP en agregados granulares de material arcilloso (tierra diatomea), solución acuosa (agua bidestilada, y mucílago de nopal) y NEP de la especie *Steinernema glaseri* con forma esférica (Matadamas et al, 2014) (Figura 2), como una alternativa para el combate de la plaga de gallina ciega (*Phyllophaga spp.*), en cultivos de maíz. Tan solo en Oaxaca existen 542,594 ha cultivadas de maíz, de las cuales 57,784 ha son afectadas anualmente por la gallina ciega (*Phyllophaga spp.*), con una pérdida anual de \$ 290.3 millones de pesos (SAGARPA, 2010). Girón (2008) determinó que *S. glaseri* es la especie de mayor efectividad con una dosis letal DL_{95} de 1035 infectivos juveniles (IJ) para causar la muerte de larvas de gallina ciega (*Phyllophaga spp.*).

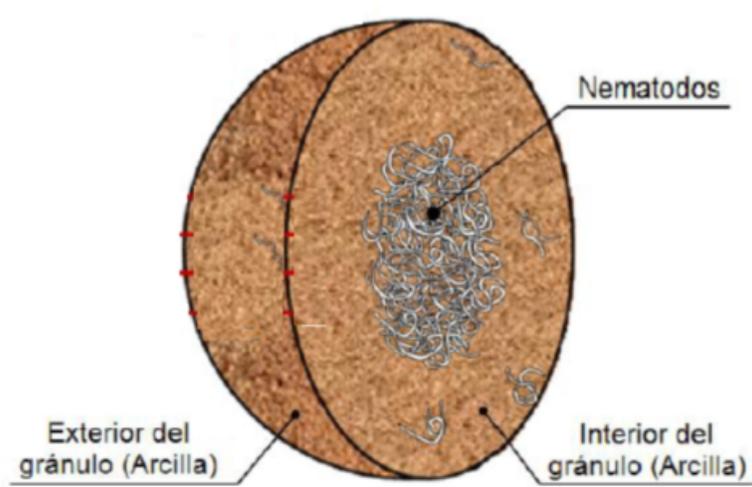


Figura 2. Agregado granular de material arcilloso, solución acuosa y nematodos entomopatógenos.

Sin embargo, aún es necesario desarrollar, perfeccionar y evaluar en campo dicha formulación como un bioplaguicida de aplicación directa al suelo, en los tres aspectos que se están abordando en la actualidad los cuales son (i) crianza y reproducción de NEP en donde se seleccionan los mejores individuos, la formulación de estos con requerimientos específicos acorde a cada especie de NEP y por último su aplicación en campo la cual es compleja por la cantidad de variables que no se pueden controlar como son temperatura, humedad relativa, la competencia con otros organismos del suelo, etc. Las tres líneas de investigación mencionadas también tienen sus propias ramas de investigación las cuales se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Investigaciones sobre bioplaguicidas agrícolas con NEP en el CIIDIR-Oaxaca.

CRIANZA Y REPRODUCCIÓN	FORMULACIÓN	APLICACIÓN EN CAMPO
Selección de los mejores individuos para ser pelletizados	Aumentar el tiempo de supervivencia de los Nematodos entomopatógenos	Evaluación en campo
	Desarrollo de formulaciones para aplicación directa	Comparación con plaguicidas químicos
		Estandarización como bioplaguicida

Dentro de los avances importantes que se han tenido en el CIIDIR-Oaxaca se encuentra el incremento de la supervivencia de los NEP pelletizados: (i) Mendoza (2012) evaluó la influencia que tiene la resistencia última a la compresión del pellet en el tiempo de supervivencia de los NEP *S. glaseri*, así mismo valoró la combinación de distintos materiales arcillosos como son TD y atapulguita, distintas soluciones acuosas dentro de las cuales se encuentran el glicerol, grenetina estándar y mucilago de nopal

todos ellos en distintos porcentajes, con el objetivo de mantener y disminuir la pérdida de humedad del pellet, en condiciones ambientales no controladas, para obtener un incremento en la supervivencia de los NEP, (ii) Cruz-Martínez (2013) propuso el recubrimiento del núcleo contenedor de NEP con mucilago de nopal y el recubrimiento superficial del pellet con aceite de oliva como una película protectora que recubre al pellet, la cual tiene como propósito sellar los canales y capilares dentro de la estructura del pellet para minimizar la pérdida de humedad, en humedades relativas controladas, obteniendo una supervivencia del 50% en un periodo de 40 días, superando los 7 días obtenidos por Mendoza (2012) con el mismo porcentaje de supervivencia.

Una vez alcanzado las metas de aumentar el tiempo de supervivencia de los NEP existe un factor de suma importancia a la hora de su aplicación específicamente en las formulaciones de aplicación directa al suelo como son pellets, WG y cadáveres que es la liberación de los NEP. Bedding (1988) menciona que un factor que puede retrasar o impedir las funciones fisiológicas naturales de los NEP en la fase de aplicación es la oportuna liberación de los NEP de la formulación para que logren emerger, buscar, infectar y matar a la plaga. Es por ello que se han desarrollado distintas tecnologías para provocar la liberación de los NEP las cuales se mencionan a continuación: (i) agregar una semilla de tomate o crucífero al WG en el proceso de formación para que provoque la fractura de su estructura, como consecuencia de la germinación de las semillas (Kaya et al, 1987), (ii) Kaya y Nelsen, 1985 elaboran un WG comestible a base de alginato de calcio para el insecto plaga, así los NEP fueron liberados dentro de ellos, una vez que estos hayan comido el WG, sin embargo existe la posibilidad de que ocasionen daños a insectos benéficos mismos que como la plaga ingieren el WG, ocasionado un daño colateral a la población benéfica, (iii) Hiltbold (2012) evaluó el impacto del proceso de la elaboración de WG de diferente grosor, en la capacidad de liberación de los NEP. Las capsulas se forman al dejar caer una gota de solución de calcio contenedora de NEP en un baño de alginato, que al contacto con esta se polimeriza formando una esfera, los distintos tiempos de polimerización determina el grosor de las capsulas, teniendo como resultado el tiempo óptimo de polimerización de siete minutos.

1.2 PROBLEMA TÉCNICO DE LA INVESTIGACIÓN

Hasta ahora, las técnicas de liberación de NEP en formulaciones de aplicación directa al suelo necesitan de recursos adicionales, lo que provoca incrementos en su costo, mayores problemas y/o pasos en el proceso de elaboración, haciéndose éste más complicado. Por ello es necesario el desarrollo de tecnologías más simples de liberación que no incrementen los costos de elaboración y de requerimientos mínimos en su aplicación, por ejemplo con la disgregación mecánica a consecuencia del impacto del pellet sobre el suelo y su posterior rehidratación para la reactivación de los NEP formulados, sin embargo en la actualidad se desconoce la influencia que tiene la disgregación mecánica y los porcentajes de rehidratación sobre las propiedades mecánicas de cizalladura del pellet, su disgregación estructural y la infectividad de los NEP, es por ello que se hace necesario estudiar y conocer estos fenómenos para poder determinar la emergencia de los NEP en función de la disgregación mecánica y la rehidratación del pellet, para que los NEP logren emerger y su posterior proliferación para la búsqueda, infección y muerte del insecto plaga.

1.3 JUSTIFICACIÓN

Con la presente investigación se estudiará, conocerá y evaluará el efecto de la disgregación tanto mecánica como por rehidratación del pellet en la emergencia de los NEP *S. glaseri* encapsulados mecánicamente y el comportamiento mecánico la microestructura del pellet al ser rehidratado, con lo que se contribuirá a favorecer el diseño de reservorios granulares, específicamente contribuyendo a las especificaciones de diseño de pellets. Se aprovecha un recurso natural como lo son los NEP para el control de plagas agrícolas como lo es la gallina ciega (*Phyllophaga spp.*) lo que conllevaría a disminuir los daños al ser humano y ambientales provocados por el uso indiscriminado de plaguicidas químicos. Un factor importante a considerar es que los NEP están exentos del registro por la agencia de protección del medio ambiente de los Estados Unidos (EPA), ya que no representa riesgo para el ser humano o al medio ambiente, mientras que la norma mexicana NOM-037-FITO-1995 autoriza su aplicación

como agente de control de plagas, teniendo como consecuencia una tecnología de liberación de NEP económica y de mínimos requerimientos, eliminado el uso de componentes adicionales para dicha acción.

1.4 HIPÓTESIS

“La emergencia e infectividad de los nematodos entomopatógenos *Steinernema glaseri* no es afectada por la energía absorbida en la disgregación mecánica y nivel de rehidratación del pellet”

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de la disgregación mecánica y nivel de rehidratación del pellet en la emergencia de NEP *Steinernema glaseri* encapsulados mecánicamente, mediante ensayos de laboratorio.

1.5.2 Objetivos específicos

- Determinar el nivel de rehidratación del pellet para provocar su disgregación y su capacidad de absorción máxima de agua.
- Analizar la cohesión microestructural del pellet en función de su nivel de rehidratación, mediante ensayos de cizalladura.
- Determinar la energía de impacto necesaria del pellet para su disgregación mecánica sin adición de humedad.
- Determinar la energía de disgregación mecánica y nivel de rehidratación mínimos requeridos en el pellet para la máxima liberación de los NEP *S. glaseri*.
- Evaluar si la infectividad y patogenicidad de los NEP *S. glaseri* emergidos es afectado por la disgregación mecánica y rehidratación del pellet.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 ENSAYO DE CIZALLADURA

La cohesión microestructural (C') en agregados granulares es una función de su esfuerzo cortante, en estos materiales la resistencia al corte depende de la cantidad de fluido que rellenen sus poros. El criterio de ruptura de un material granular deriva de la teoría de Mohr-Coulomb que relaciona tensiones efectivas normales y tangenciales actuando en cualquier plano. Este criterio establece que la resistencia al corte viene dada por la ecuación:

$$\tau = C' + \sigma' \tan \theta$$

donde:

τ (N/m^2): Resistencia al corte

C' (N/m^2): Cohesión

σ (N/m^2): Tensión normal actuando sobre el material granular.

θ : Ángulo de rozamiento efectivo

Los ensayos de cizalladura para materiales granulares se realizan mediante la celda de Jenike (1964), un dispositivo específico para pruebas de corte directo y formalizado en una norma internacional. En la Figura 3 se muestra la composición de la celda de Jenike de acuerdo con la norma ASTM D6128-00.

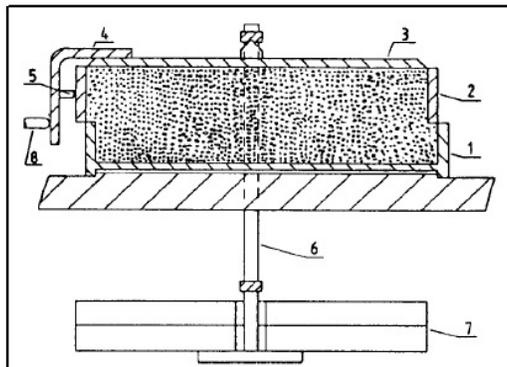


Figura 3. Celda de corte de acuerdo a la norma ASTM D6128-00: (1) anillo de corte inferior, (2) anillo de corte superior, (3) tapa de la celda de corte, (4) soporte, (5) perno, (6) percha, (7) pesas.

Antes del corte, el anillo superior se pone en una posición compensada igual según lo muestra la Figura 3. Una fuerza vertical F_v se aplica a la tapa, y por lo tanto a las partículas del material dentro de la celda por medio de una percha (6) que contiene pesas (7). Una fuerza horizontal medida es aplicada al soporte por un vástago mecánicamente conducido (8). En la Figura 4 se muestra la celda de Jenike empleada para realizar pruebas de corte directo para materiales granulares.



Figura 4. Celda de Jenike utilizada para pruebas de corte directo en materiales granulares.

2.2 ESTABILIDAD Y FALLA ESTRUCTURAL

La definición de la estabilidad estructural de cualquier elemento se enuncia a continuación: “Es un estado que bajo cualquier alteración tiende a prevalecer hasta que un factor externo o interno lleva al componente o sistema estructural a pasar del dominio estable al dominio inestable.”

Con la definición anterior y para fines de esta investigación nos referiremos al pellet como el elemento que bajo cualquier alteración tiende a permanecer en su estado sólido, el factor externo que va alterar su estado sólido serán la humedad absorbida por el mismo y el dominio inestable será el momento en el cual el pellet deje su estado sólido para pasar a un estado de fluido.

2.3 MIGRACIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS.

Grewal (2000b) logró llevar a *S. carpocapsae*, *S. feltiae* y *S. riobrave* a un estado anhidrobiótico. En el mismo artículo se menciona que *S. carpocapsae* fue más fácil de llevar al estado de anhidrobiosis en comparación de *S. feltiae* y *S. riobrave*, esto debido a que los últimos tienen un comportamiento de cazador a la hora de buscar a insectos-plagas, en comparación con *S. carpocapsae* que su estrategia de búsqueda es de emboscador (Shapiro-Ilan et al, 2012), es así que *S. feltiae* y *S. riobrave* tienden a evitar la desecación. Al revisar la cantidad de NEP en WG se encontró un número menor de los originalmente encapsulados.

La pérdida de NEP de los WG se atribuye a la estrategia de búsqueda, ya que *S. riobrave* y *S. feltiae* al ser cazadores tiene una mayor movilidad dentro del WG lo que ocasiona que algunos de estos NEP no entren a un estado parcial de anhidrobiosis y salgan del WG, fenómeno conocido como migración de NEP. Cabe señalar que *S. glaseri* que es el NEP de estudio en esta investigación presenta el mismo comportamiento de cazador al igual que *S. feltiae* y *S. riobrave*.

2.4 DISGREGACIÓN POR REHIDRATACIÓN DEL PELLET.

Para el estudio del fenómeno de la disgregación del pellet solo por el efecto de la rehidratación se empieza por la elaboración del pellet, el cual al inicio del proceso el material arcilloso del cual está compuesto (TD) se encuentra en un estado seco (polvo), posteriormente al ser procesado para la obtención de una matriz granular esta obtiene humedad, llegando al final del proceso como un agregado sólido. La cohesión existente entre las partículas de TD es lo que mantiene estructurado al pellet y es ocasionado a las fuerzas electroestáticas que existe entre la TD y a la bipolaridad de las moléculas de agua (Clare, 2004). Juárez y Rico (2005) mencionan que la superficie de cada partícula de arcilla (TD en el pellet) posee carga eléctrica negativa, es así que las partículas de TD atraen a las moléculas de agua, estas moléculas de agua son polarizadas es decir que en ellos no coinciden los centros de gravedad de sus cargas negativas y positivas,

funcionan como dipolos permanentes, por lo tanto las moléculas de agua al unirse a las partículas de arcilla por su carga positiva, el polo de carga negativa actúa como origen de atracción de otras moléculas de agua formando puentes de hidrogeno.

La cohesión de un material arcilloso se incrementa hasta un máximo y luego decrece rápidamente al ir aumentando el contenido de humedad del mismo; esto se debe a que la cohesión es función del espesor de la película de agua conocida como "film" que rodean a las partículas arcillosas de estudio el pellet en este caso (Figura 5). La teoría del film menciona que un exceso de agua en los materiales arcillosos provoca el incremento del grosor del film, provocando un aumento de las cadena de puentes de hidrogeno y por ende el espacio entre las partículas de TD (Push, 1979), ocurriendo un deslizamiento de las partículas de TD unas sobre otras debido al distanciamiento entre ellas, es así como la masa de las arcillas se vuelve viscosa y fluye. Esta teoría permite una explicación del fenómeno de la disgregación por rehidratación del pellet.

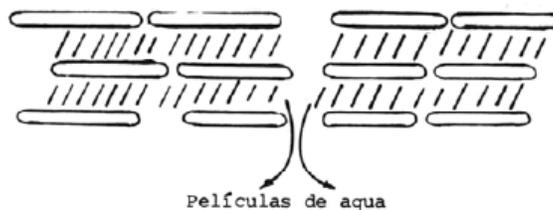


Figura 5. Película de agua "film" rodeando partículas de arcilla.

2.5 DISGREGACIÓN MECÁNICA DEL PELLETT

Un choque o colisión es un proceso en el que dos cuerpos interaccionan en un intervalo de tiempo muy breve, ejemplo sencillo de choque es una pelota que revota con el suelo o algo más complejo es la colisione de átomos (Hayakawa y Kuninaka, 2002), en este fenómeno siempre se cumple el principio de la conservación de la cantidad de movimiento y de la energía, caracterizándose por el parámetro de restitución R (Han et al, 2010). Existen dos tipos de choques (Aryaei et al, 2010) los elásticos en cual la energía cinética previa al choque se mantiene como tal después de

él ($R > 1$). Sin embargo los choques elásticos son una idealización ya que en la realidad solo se producen choques parcialmente elásticos, es decir una parte de la energía se pierde en calor o deformación y la otra se mantiene como energía cinética. En el caso de los choques inelásticos ($R < 1$), toda la energía puesta en juego se transforma en calor o deformación y no se recupera para el movimiento. En el caso particular de un pellet que se deja caer a una cierta altura, éste posee energía potencial la cual se convierte en energía cinética, el momento en el cual colisiona con el suelo, mencionado la teoría descrita anteriormente se produce un choque inelástico es así que toda la energía cinética se consume en mayor cantidad en deformar al pellet, produciéndose una disgregación mecánica y en una menor cantidad en forma de calor, cumpliendo así el principio de la conservación de la energía.

2.6 EMERGENCIA DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS.

Uniando y analizando las teorías descritas en los apartados 2.3, 2.4 y 2.5 se llega a la conclusión de que no es necesario lograr una disgregación por rehidratación completa del pellet para provocar la emergencia de los NEP, sino que es de mayor importancia determinar el porcentaje de rehidratación necesario dentro del pellet para que los NEP reactiven sus funciones de búsqueda, ocasionando una migración de NEP del pellet, así mismos determinar la energía de disgregación mecánica que ocasionado una pérdida de material granular que rodea al núcleo contenedor de NEP dentro del pellet, permitiendo una rehidratación del pellet y reactivación de los NEP más rápida para que exista una migración de NEP, y como consecuencia su emergencia para que busquen, infecten y maten al insecto plaga.

CAPÍTULO 3

MATERIALES

Y

MÉTODOS

La siguiente figura (Figura 6) se muestra un diagrama de la metodología seguida para la evaluación de la disgregación mecánica y por rehidratación del pellet en la emergencia de los NEP *S. glaseri*.

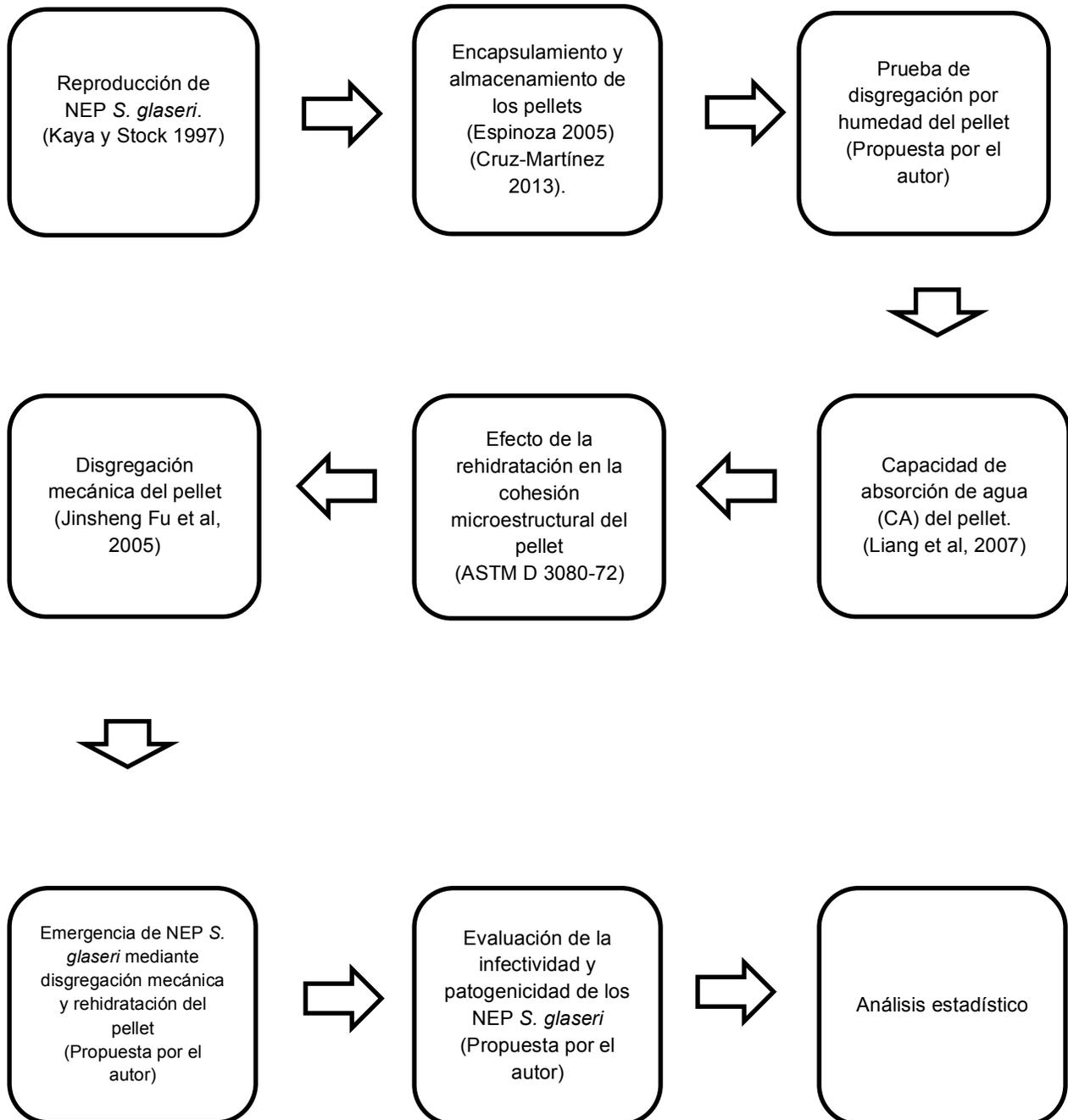


Figura 6. Proceso para la evaluación del efecto de la disgregación mecánica y por rehidratación del pellet en la emergencia de los NEP *Steinernema glaseri*.

3.1 REPRODUCCIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS *Steinernema glaseri*.

Los NEP *S. glaseri* utilizados fueron proporcionados por el laboratorio de Entomología de la Universidad de California campus Davis. La reproducción de NEP se efectuó en el Laboratorio de Control Biológico del CIIDIR IPN Unidad Oaxaca a 26.6 ± 2.4 °C, con larvas del último instar de *Gallería Mellonella* (*Lepidópteros: Pyralidos*) como hospedero. La obtención de los NEP se dio a través del método propuesto por Kaya y Stock (1997), utilizando agua bidestilada para conservarlos antes y durante el encapsulamiento, debido a que está libre de CO₂, conforme a especificaciones del fabricante, avaladas por la FEUM (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos), así mismo el grado de esterilidad no causa daños a los NEP durante su conservación (Chen y Glazer, 2005) máxima de 14 días a 11 ± 1 °C antes de ser pelletizados (Mannion et al, 1992; Shapiro et al, 2012).

3.2 ENCAPSULAMIENTO MECÁNICO DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS *Steinernema glaseri*.

Los NEP *S. glaseri* se encapsularon en TD (Celite® 209), fabricado por Celite Corporation debido a que sus características físicas y químicas del material están aprobadas para encapsular organismos vivos (Silver et al, 1995). El proceso de encapsulamiento mecánico de los NEP se realizó con el prototipo de diseñado por Espinosa (2005) (Figura 7), con los siguientes parámetros: velocidad de rotación del disco compactador de 87 rpm, ángulo de inclinación del compactador de 35.7°, tiempo de permanencia de 90 s del pellet en el disco de compactación (Matadamas et al., 2014). Para la elaboración de los pellet se usó agua bidestilada como componente único la solución acuosa contenedora de NEP. Esta solución se dosifica con una micropipeta, calibrada para originar una descarga de 200 ± 5 µL de solución que contienen 1000 ± 50 NEP. La formación del pellet se realiza al dejar caer una gota de la solución agua-NEP en cada una de las ocho estructuras cónicas llenas de TD y montadas en un soporte plano circular, después se abre la tapa de salida de los conos

para que el material fluya y logre recubrir a la solución agua-NEP, logrando un pellet semiesférico. Posteriormente pasa por un sistema compuesto por un tornillo sinfín transportador-precompactador y al final por el disco compactador.

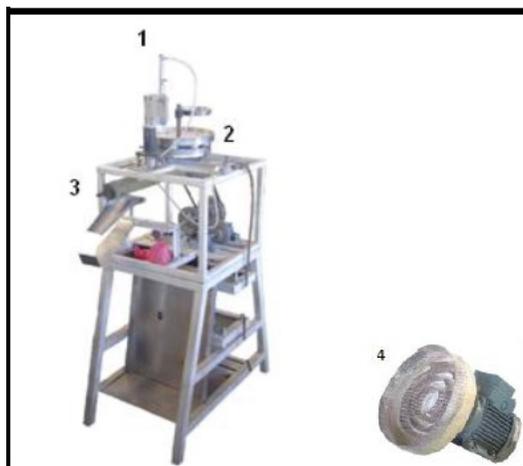


Figura 7. Máquina pelletizadora de NEP: 1) Dosificador neumático de la solución agua-NEP, (2) conos de alojamiento del material granular, (3) tornillo sinfín transportador-precompactador y (4) disco compactador.

3.3 PRUEBA DE DISGREGACIÓN POR REHIDRATACIÓN DEL PELLETT.

En una cámara nebulizadora (Reyes, 2012) de 50 x 50 x 50 cm (Figura 10), que tiene una pistola de aspersion con diámetro de boquilla de 1 mm y una presión de operación 0.061 – 0.12 MPa, para arrojar gotas de agua con un diámetro de 50 - 100 μm , se colocó un pellet, para rehidratarlo y proporcionarle porcentajes de humedad.

Los porcentajes estuvieron en base al tiempo de permanecía (T_p) en la cámara nebulizadora. Sobre la cámara nebulizadora se colocó una balanza analítica marca OHAUS con una precisión de 0.01g, a la cual se le fijo un anillo de metal de diámetro de 10 mm donde se colocó el pellet (Figura 8). La balanza de precisión registro la variación de peso del pellet debido a la absorción humedad que se le proporciono.

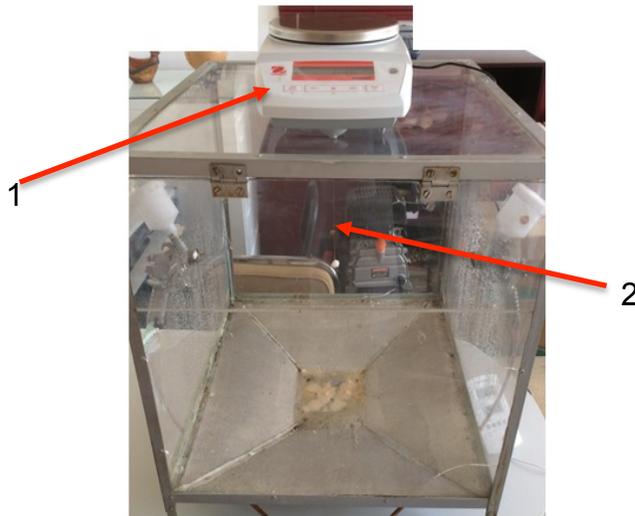


Figura 8. Cámara nebulizadora utilizada para rehidratar pellets: (1) Balanza de precisión, (2) anillo metálico soportador del pellet.

3.4 CAPACIDAD DE ABSORCIÓN MÁXIMA DE AGUA DEL PELLET

A un pellet se le proporcionó humedad hasta antes de su disgregación por rehidratación, la cual se conoció con la prueba descrita anteriormente. El pellet ya humedecido se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 90 min (Liang et al, 2007) y posteriormente el pellet humedecido se pesó, determinado la capacidad de absorción de agua (CA) de gramo por pellet mediante la siguiente ecuación:

$$CA = \frac{W}{W_0} - 1$$

donde:

W = peso del pellet humedecido.

W_0 = peso del pellet salido de la maquina pelletizadora.

3.5 EFECTO DE LA REHIDRATACIÓN EN LA COHESIÓN MICROESTRUCTURAL DEL PELLET

Un pellet se rehidrato en la cámara de nebulización del aparrado 3.3, posteriormente en un plano inclinado (Figura 9) se montó un inclinómetro y un dado que simuló la celda de Jenike (ver Figura 3) donde se colocó el pellet salido de la cámara nebulizadora, sobre este se puso otro dado con un peso conocido.

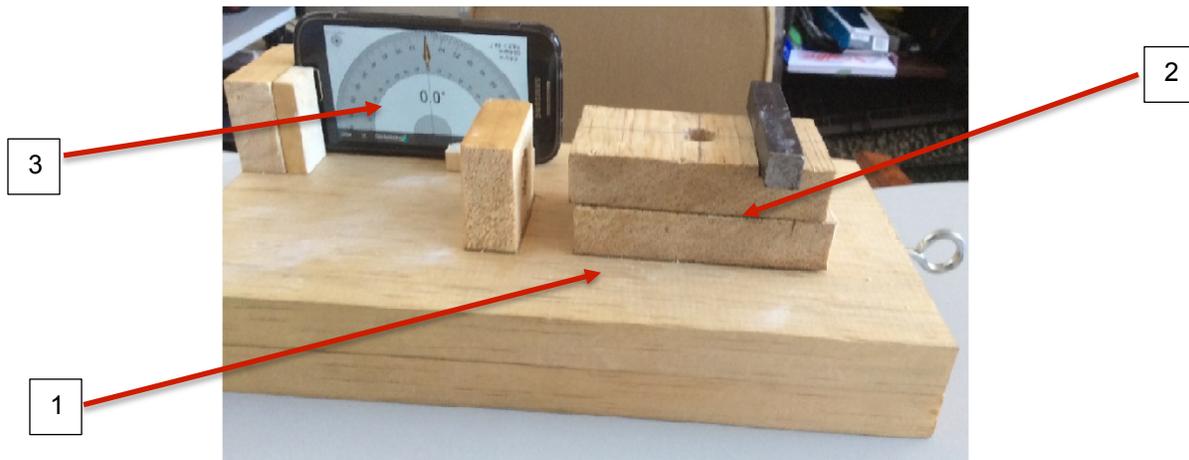


Figura 9. Plano inclinado para determinar la fuerza de cohesión del pellet: (1) Dado inferior fijo, (2) dado superior móvil, (3) inclinómetro.

Una cámara de video filma la variación del ángulo de inclinación del plano θ , para conocer el momento justo de inminente deslizamiento del dado superior determinando la fuerza de cohesión del pellet (F_R), mediante la siguiente ecuación:

$$\sum Fy = (W \sin \theta) - (F_R) - (f_f) = 0$$

Para el cálculo de la cohesión microestructural se empleó la siguiente ecuación:

$$C' = \frac{F_R}{A_T}$$

Donde:

C' = cohesión microestructural del pellet.

F_R = fuerza de cohesión del pellet.

A_T = área de la sección transversal del pelle.

Para la prueba se emplearon seis pellets siendo este número, el doble del mínimo de pruebas que marca la norma ASTM D3080-72 para ensayos de esfuerzo cortante para materiales granulares.

3.6 DISGREGACIÓN MECÁNICA DEL PELLET.

En esta prueba se utilizó la metodología de Jinsheng Fu, et al (2005) modificada la cual se describe a continuación: un pellet se le proporciono energía potencial dejándolo caer a cuatro distintas alturas sobre una muestra de suelo agrícola seca como una simulación de su aplicación en campo con la siguiente granulometría: 90.4% de arena, 5% de limo y 4.6% de arcilla la cual se colocó en un recipiente de 10 x 6 x 7 cm.

El pellet puesto a prueba se pesó en una balanza analítica marca Ohaus con una sensibilidad de 0.01 g antes y después del impacto y para determinar su grado de disgregación mecánica se empleó la siguiente ecuación:

$$f = \frac{M}{M_0}$$

Donde:

f = relación de disgregación granular.

M = masa del pellet después de impacto.

M_0 = masa del pellet antes del impacto.

3.7 EMERGENCIA DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS *Steinernema glaseri*.

En una caja Petri de nueve cm de diámetro en cuyo interior se puso papel filtro Whatman No.1 el cual se humedecido con 1 mL de agua bidestilada, se colocó un pellet, que previamente se le aplicaron pruebas de disgregación mecánica y por nivel de rehidratación, los NEP que lograron emerger del pellet se deslizaron por el papel filtro humedecido. Posteriormente la caja de Petri se llevó a un microscopio estereoscopio para contabilizar los NEP que lograron salir del pellet mediante el método de Chen y Glazer (2005).

3.8 EVALUACIÓN DE LA INFECTIVIDAD Y PATOGENICIDAD DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS *Steinernema glaseri*.

Determinada la energía de impacto que mayor emergencia de NEP ocasiono, se eligieron tres puntos de la curva obtenida en la prueba de emergencia de los NEP, realizando la prueba de infectividad de los NEP con larvas de último instar de *Galleria mellonella* y patogenicidad con larvas del tercer estadio de *Phyllophaga spp.* La prueba consistió en colocar un pellet disgregado mecánicamente con una energía de impacto de 0.6 m y con tres distintos porcentajes de rehidratación en una trampa White en cuyo interior en lugar de agua bidestilada se introdujo una larva. Pasadas 72 horas se contabilizo el número de larvas vivas y muertas, las ultimas se volvieron a colocar en una trampa White para verificar que se muerte haya sido a cusa de NEP.

3.9 DISEÑO EXPERIMENTAL

3.9.1 Experimento 1

Este experimento tuvo como objetivo provocar la disgregación del pellet (DR), al variar el nivel de rehidratación del mismo, mediante cinco tiempos de permanencia (Tp) en una cámara nebulizadora (10, 20, 30, 40 y 50 segundos) más un testigo que fue un

pellet sin rehidratar. Se tiene un diseño experimental de 1 factor (tiempo de permanencia en la cámara nebulizadora) con cinco tratamientos y cinco repeticiones (Tabla 2), para cada tratamiento se emplearon cinco pellets (Liang et al, 2007). La variable independiente es tiempo de permanencia y las variables dependientes fueron los microlitros de agua absorbidos (μL) y peso de pellet (g).

Tabla 2. Diseño experimental de la disgregación por rehidratación del pellet.

Tiempo de permanencia (T_p)	Pellet 1		Pellet 2		Pellet 3		Pellet N	
	W	A	W	A	W	A	W	A
10 seg	g	μL	g	μL	g	μL	g	μL
20 seg	g	μL	g	μL	g	μL	g	μL
30 seg	g	μL	g	μL	g	μL	g	μL
40 seg	g	μL	g	μL	g	μL	g	μL
50 seg	g	μL	g	μL	g	μL	g	μL
Testigo	g	μL	g	μL	g	μL	g	μL

W: peso., g: Gramos. T_p : tiempo de permanencia A: Absorción de agua. μL : micro litros

3.9.2 Experimento 2

Se analizó el comportamiento de la cohesión microestructural del pellet ($^{\circ}\text{C}$) al variar el nivel de rehidratación del mismo mediante cuatro TP en la cámara nebulizadora (10, 20, 30, y 40 segundos). Se tiene un diseño experimental de 1 factor que T_p con cuatro niveles más el testigo que es un pellet sin rehidratar (Tabla 3). Para cada tratamiento se emplearon seis pellets (ASTM D3080-72). La variable independiente es (T_p) y la variable dependiente es la cohesión microestructural del pellet ($^{\circ}\text{C}$).

Tabla 3. Diseño experimental del efecto de la rehidratación en la cohesión microestructural del pellet.

Tiempo de Permanencia (Tp)	Cohesión microestructural (g/mm ²)					
	Pellet 1	Pellet 2	Pellet 3	Pellet 4	Pellet 5	Pellet 6
Testigo	C'	C'	C'	C'	C'	C'
10 seg	C'	C'	C'	C'	C'	C'
20 seg	C'	C'	C'	C'	C'	C'
30 seg	C'	C'	C'	C'	C'	C'
40 seg	C'	C'	C'	C'	C'	C'

C': Cohesión microestructural del pellet

3.9.3 Experimento 3

Este experimento tuvo como objetivo conocer la energía de impacto para provocar la disgregación mecánica (DM) del pellet. Se tiene un diseño experimental de 1 factor (energía de impacto) con cuatro tratamientos y cinco repeticiones (Tabla 4), para cada tratamiento se emplearon 20 pellets (Jinsheng Fu et al, 2005). La variable independiente es energía de impacto y la variable respuesta es la relación de disgregación granular (f).

Tabla 4. Diseño experimental de la energía de impacto para disgregación mecánica del pellet.

Energía de impacto (m)	Relación de disgregación granular					
	Pellet 1	Pellet 2	Pellet 3	Pellet 4	Pellet 5	Pellet n
0.20	f	f	f	f	f	f
0.40	f	f	f	f	f	f
0.60	f	f	f	f	f	f
0.80	f	f	f	f	f	f

f : Relación de supervivencia granular, m : metros

3.9.4 Experimento 4

El experimento tuvo como propósito determinar el nivel de rehidratación (NR) y la disgregación mecánica (DM) mínimos requeridos por el pellet para provocar el mayor número de NEP *S. glaseri* emergidos. Se tiene un diseño experimental de dos factores que son NR y DM (Tabla 5). Para cada tratamiento se utilizaron cinco pellets (Hiltbold et al, 2012). La variable dependiente fue el número de NEP que emergieron del pellet. Los niveles para el factor nivel de rehidratación fueron cinco porcentajes antes de la CA máxima de agua del pellet.

Tabla 5. Diseño experimental del efecto de la disgregación mecánica y rehidratación del pellet en la emergencia de los NEP *S. glaseri*.

DM (m)	NR (%)					
	0	10	30	50	70	90
0	NEP-E	NEP-E	NEP-E	NEP-E	NEP-E	NEP-E
0.20	NEP-E	NEP-E	NEP-E	NEP-E	NEP-E	NEP-E
0.40	NEP-E	NEP-E	NEP-E	NEP-E	NEP-E	NEP-E
0.60	NEP-E	NEP-E	NEP-E	NEP-E	NEP-E	NEP-E
0.80	NEP-E	NEP-E	NEP-E	NEP-E	NEP-E	NEP-E

NEP-E: Nematodos entomopatógenos emergidos

3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- Todos los experimentos se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey para conocer si existe diferencias significativas en los tratamientos utilizando el programa estadístico de Minitab 17, en la prueba de infectividad y patogenicidad los datos se analizaron con el programa estadístico SAS.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 DISGREGACIÓN POR REHIDRATACIÓN DEL PELLETT.

Los resultados del comportamiento de la masa y los μL de agua absorbidos por el pellet así como el análisis estadístico se encuentran en las Tablas 6 y 7. Se realizó una ANOVA para determinar si existe diferencia significativa ($P < 0.05$) en la masa del pellet al ser rehidratado en la cámara nebulizadora.

Tabla 6. Comportamiento de la masa y μL de agua absorbidos por el pellet.

Tp (seg)	Pellet 1		Pellet 2		Pellet 3		Pellet 4		Pellet 5	
	m (g)	A (μL)								
10	0.43	62	0.35	65	0.42	72	0.40	62	0.35	59
20	0.54	192	0.48	185	0.53	198	0.54	194	0.51	182
30	0.69	321	0.63	350	0.68	308	0.62	324	0.62	328
40	0.32	475	0.28	486	0.27	472	0.27	461	0.27	459
50	0.05	622	0.06	654	0.06	618	0.08	623	0.06	617
Testigo	0.31	0	0.31	0	0.32	0	0.34	0	0.34	0

Tp: tiempo de permanencia, m: masa, g: gramos, A: absorción de agua, μL : Microlitros

Tabla 7. Análisis estadístico de los resultados de la disgregación por rehidratación del pellet.

Tiempo	Permanencia	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
10	25	0.3900	0.0381	(0.3659, 0.4141)	
20	25	0.5200	0.0255	(0.4959, 0.5441)	
30	25	0.6480	0.0342	(0.6239, 0.6721)	
40	25	0.2820	0.0216	(0.2579, 0.3061)	
50	25	0.0620	0.0109	(0.0379, 0.0861)	
Testigo	25	0.3240	0.0151	(0.2999, 0.3481)	

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tiempo	Permanencia	N	Media	Agrupación
30	25	0.6480	A	
20	25	0.5200	B	
10	25	0.3900	C	
Testigo	25	0.3240	D	
40	25	0.2820	D	
50	25	0.0620	E	

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

El análisis estadístico demostró que el pellet al ser rehidratado en los cinco Tp en la cámara nebulizadora la masa final obtenida por la absorción de agua es estadísticamente diferentes, con excepción del testigo y TP 40 donde el pellet pierde toda la masa ganada en la rehidratación para nuevamente obtener su masa inicial.

En las Figura 10 y 11 se aprecia el comportamiento de la masa y los μL de agua absorción por el pellet, en donde Tp 10, Tp 20 y Tp 30 el aumento en la masa del pellet tiene un comportamiento prácticamente lineal, correspondientes a una absorción de $64 \pm 4.43 \mu\text{L}$, $190.2 \pm 5.88 \mu\text{L}$, y $326.2 \pm 13.66 \mu\text{L}$ de agua, obteniendo una masa final de $0.39 \pm 0.04 \text{ g}$, $0.52 \pm 0.03 \text{ g}$ y $0.65 \pm 0.03 \text{ g}$ respectivamente. El punto crítico donde la masa de pellet sufre una perdida corresponde una rehidratación mayor de $326.2 \pm 13.66 \mu\text{L}$ de agua pasando así de una masa máxima de $0.65 \pm 0.03 \text{ g}$ a una masa mínima de $0.06 \pm 0.01 \text{ g}$ correspondientes una rehidratación de $626.8 \pm 15.42 \mu\text{L}$ de agua.

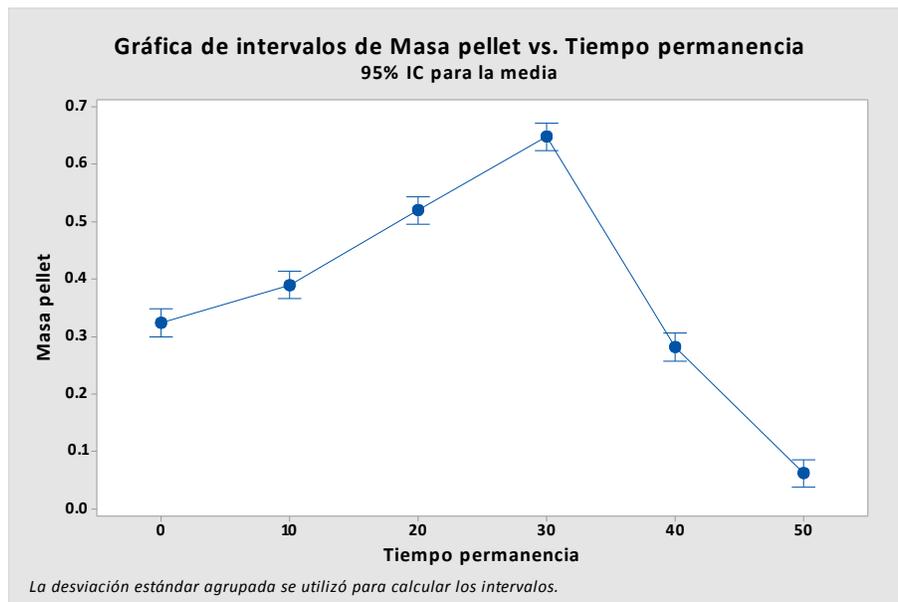


Figura 10. Grafica del comportamiento de la masa del pellet en función del Tp en la cámara nebulizadora.

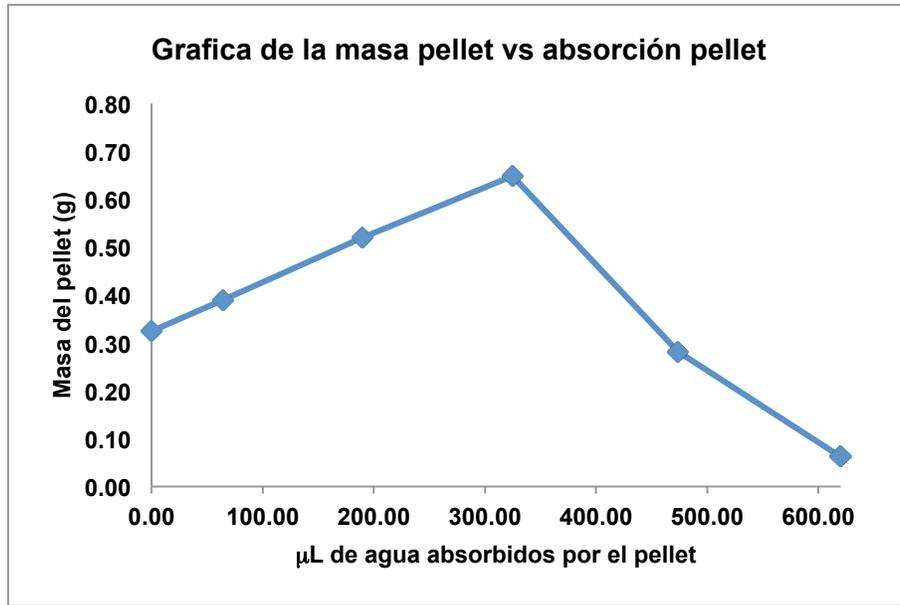


Figura 11. Grafica del comportamiento de la masa del pellet vs µL de agua absorbidos.

4.2 CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE MÁXIMA DE AGUA DEL PELLETT.

Identificado el T_p máximo en la cámara nebulizadora en el cual el pellet se disgrega por rehidratación, se procedió a calcular la CA máxima de agua del pellet, mostrándose en la Tabla 8 los resultados del promedio de diez pellets con sus cinco repeticiones.

Tabla 8. Resultados de la masa inicial y final de los pellets empleados para determinar la CA máxima de agua.

Masa del pellet (g)	Pellet									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Inicial	0.35	0.31	0.31	0.32	0.34	0.34	0.32	0.32	0.33	0.32
Final	0.71	0.61	0.61	0.60	0.62	0.63	0.58	0.60	0.61	0.69

Terminado el proceso de elaboración mecánica del pellet este posee una masa promedio de 0.33 ± 0.01 g que al ser rehidratado en la cámara nebulizadora en un T_p máximo de 30 seg este absorbe humedad obteniendo una masa final de 0.63 ± 0.04 g

sin disgregarse, a partir de estos datos se calculó la CA del pellet con la siguiente ecuación:

$$CA = \frac{0.63}{0.33} - 1 = 90.90\%$$

Es así que la TD de la cual está elaborado el pellet es una material arcillo que posee gran capacidad de absorción y es necesario que este se rehidrate más del 90.90% de peso en agua para que su estructura falle y pase de un estado sólido a un estado de fluido.

4.3 EFECTO DE LA REHIDRATACIÓN EN LA COHESIÓN MICROESTRUCTURAL DEL PELLET.

En la Tabla 9 se muestran los resultados del comportamiento de la 'C del pellet al ser rehidratado en cuatro distintos Tp en la cámara nebulizadora. Para el Tp de 50 el pellet presento un alto grado de disgregación es por ellos que no pudo ser manejable para ser traslado al plano inclinado simulador de la celda de Jenike.

Tabla 9. Resultados de la cohesión microestructural del pellet.

Tiempo de Permanencia (Tp)	Cohesión microestructural (g/mm ²)					
	Pellet 1	Pellet 2	Pellet 3	Pellet 4	Pellet 5	Pellet 6
Testigo	0.76	0.76	0.75	0.58	0.75	0.75
10	0.78	0.66	0.78	0.78	0.77	0.79
20	0.79	0.80	0.79	0.81	0.80	0.81
30	0.82	0.81	0.80	0.81	0.81	0.82
40	0.42	0.40	0.48	0.45	0.46	0.42

El comportamiento de la 'C del pellet durante los Tp en la cámara nebulizadora se observan en la Figura 12, realizándose un ANOVA y posteriormente una prueba de Tukey (p<0.5) para determinar si existe alguna diferencia significativa en la cohesión microestructural del pellet al ser rehidratado en los cuatro distintos Tp en la cámara

nebulizadora. En la Tabla 10 se muestran los resultados de análisis estadístico realizado a los datos de la Tabla 8.

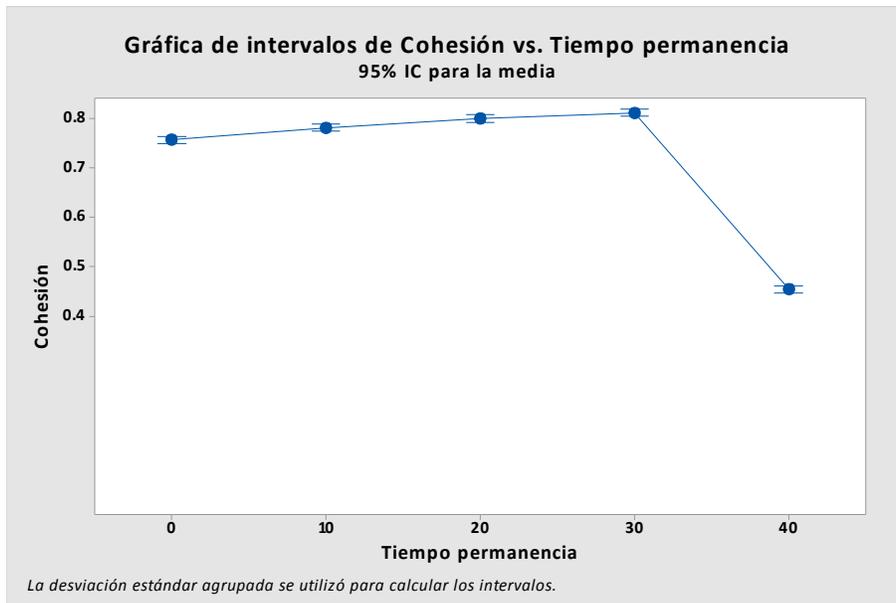


Figura 12. Grafica del comportamiento de la \dot{C} del pellet en los 4 Tp en la cámara nebulizadora.

Tabla 10. Diferencia en la cohesión media de los pellets al ser rehidratados en la cámara nebulizadora.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%			
Tiempo Permanencia	N	Media	Agrupación
30	6	0.8116	A
20	6	0.8000	A
10	6	0.7816	B
0	6	0.7566	C
40	6	0.4550	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferente

El análisis estadístico demostró que un pellet una vez terminado su proceso de elaboración posee una \dot{C} de 0.75 g/mm^2 . Al ser rehidratado su \dot{C} aumenta en un máximo de 0.81 g/mm^2 correspondientes a un Tp en la cámara nebulizadora de 20 y 30 seg, decreciendo rápidamente hasta llegar a 0.45 g/mm^2 . La prueba de Tukey demostró

que en los demás tratamientos existe una diferencia significativa para la cohesión del pellet, esto quiere decir es la cohesión se va incrementando con forme se rehidrata el pellet y desmulle si se sigue rehidrato. Graficando la τ_c del pellet en función de los μL de agua absorbidos (Figura 13) se observa que en Tp 20 el pellet absorbe 192 μL que es mucho menor que los 320 μL correspondiente a Tp 30, sin embargo para estos dos puntos la τ_c del pellet son estadísticamente iguales.

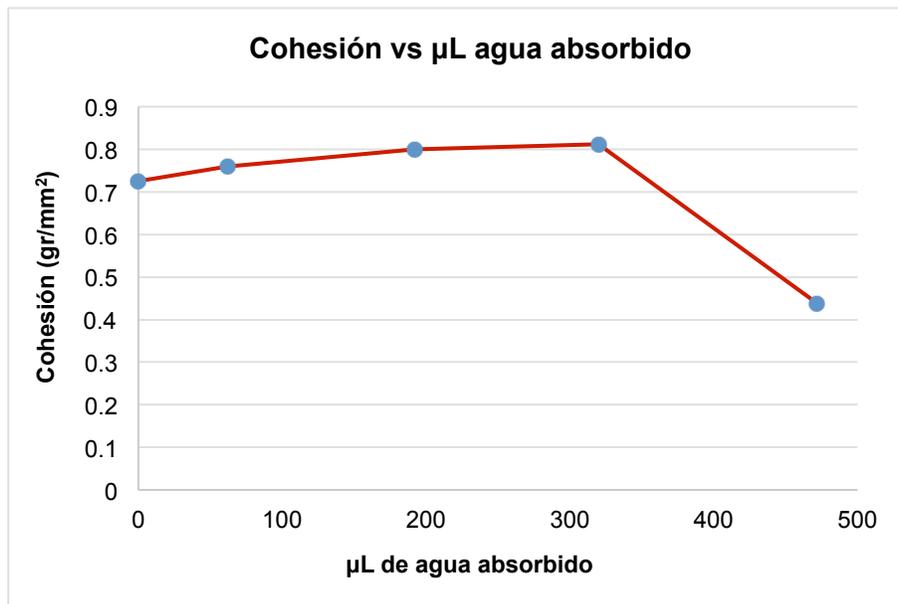


Figura 13. Grafica del comportamiento de la τ_c vs μl de agua absorbidos.

4.4 DISGREGACIÓN MECÁNICA DEL PELLETT.

La disgregación mecánica sin rehidratación del pellet demostró que en las dos primeras energías de impacto de 0.2 y 0.4 m el pellet tiene una alta relación de persistencia granular (f) (Figura 14) que corresponden a 0.92 ± 0.05 y 0.92 ± 0.04 ambas de cercana a 1. Para las dos últimas energías de impacto de 0.6 y 0.8 m existe una disgregación mecánica más evidente con una f de 0.51 ± 0.05 y 0.42 ± 0.07 respectivamente, es decir que es necesario una energía mínima de impacto de 0.6 m para que en momento de que el pellet colisione con el suelo la energía cinética que

posee se pierda en una mayor medida en provocar una disgregación de pellet y una menor parte en calor.

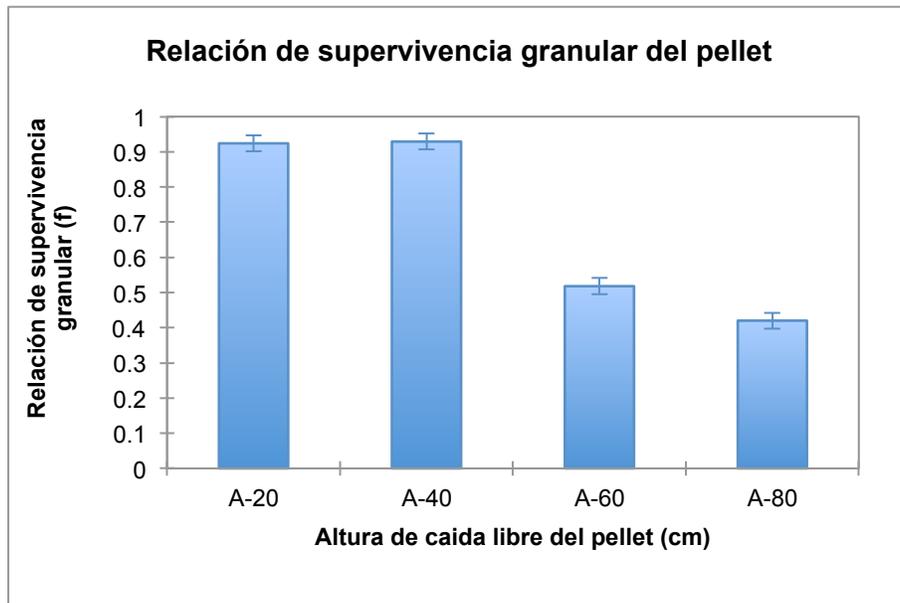


Figura 14. Relación de supervivencia granular en función de la energía de disgregación del pellet.

El análisis estadístico (Cuadro 3) demostró que f en las dos primeras energías de impacto son estadísticamente iguales es decir que las energías de 0.2 y 0.4 m producen el mismo grado de disgregación mecánica en el pellet. Para las dos últimas energías de impacto son significativamente diferentes entre ellas y con las dos primeras de 0.2 m y 0.4 m

Tabla 11. Diferencia entre las relaciones de disgregación granular medias de los pellets al ser disgregados mecánicamente.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%			
Energía	N	Media	Agrupación
0.4	100	0.9290	A
0.2	100	0.9240	A
0.6	100	0.5180	B
0.8	100	0.4200	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

4.5 EMERGENCIA DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS *Steinernema glaseri*.

En la Tabla 12 se muestran los resultados del número de NEP que emergieron en los distintos tratamientos del diseño experimental de dos factores, tomándose en cuenta que el número de NEP encapsulados en cada pellet fue de 1000 ± 50 NEP.

Tabla 12. Número de NEP *S. glaseri* emergidos de los tratamientos disgregación mecánica y rehidratación del pellet.

DM (m)	RH del pellet (%)					
	0	10	30	50	70	90
0	2	377	459	727	533	599
0.2	3	373	457	777	513	545
0.4	2	339	491	910	847	575
0.6	2	329	468	1016	562	522
0.8	2	391	502	968	391	542

A los datos obtenidos se les realizó un ANOVA (Tabla 13) de dos factores y las cinco réplicas se realizaron en bloques. El análisis estadístico demostró que existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) en los tratamientos de energía de disgregación y porcentaje de rehidratación del pellet, así mismo en la interacción que existe entre ellos.

Tabla 13. Análisis de varianza realizado al diseño experimental de emergencia de NEP.

Análisis de varianza para respuesta transformada						
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p	
Modelo	33	45254.5	1371.35	1420.22	0.000	
Bloques	4	4.7	1.19	1.23	0.302	
Lineal	9	43767.8	4863.09	5036.40	0.000	
Altura	4	240.5	60.13	62.27	0.000	
%Rehidratación	5	43527.3	8705.45	9015.69	0.000	
Interacciones de 2 términos	20	1482.0	74.10	76.74	0.000	
Altura*%Humedad	20	1482.0	74.10	76.74	0.000	
Error	116	112.0	0.97			
Total	149	45366.5				

La Figura 15 muestra los efectos principales sobre la variable respuesta emergencia de NEP, donde la disgregación mecánica no tiene algún efecto sobre la emergencia. En lo que corresponde al factor porcentaje de rehidratación en los tres primeros porcentajes de 10, 30 y 50% el número de NEP emergidos del pellet corresponden a 356.36, 475.18 y 875.88 NEP, siendo este último porcentaje de 50% el tratamiento que mayor emergencia de NEP obtuvo. Pasando este porcentaje de rehidratación del pellet los NEP emergidos reducen drásticamente siendo de 559.87 y 556.13 NEP para los porcentajes de 70 y 90% de rehidratación del pellet.

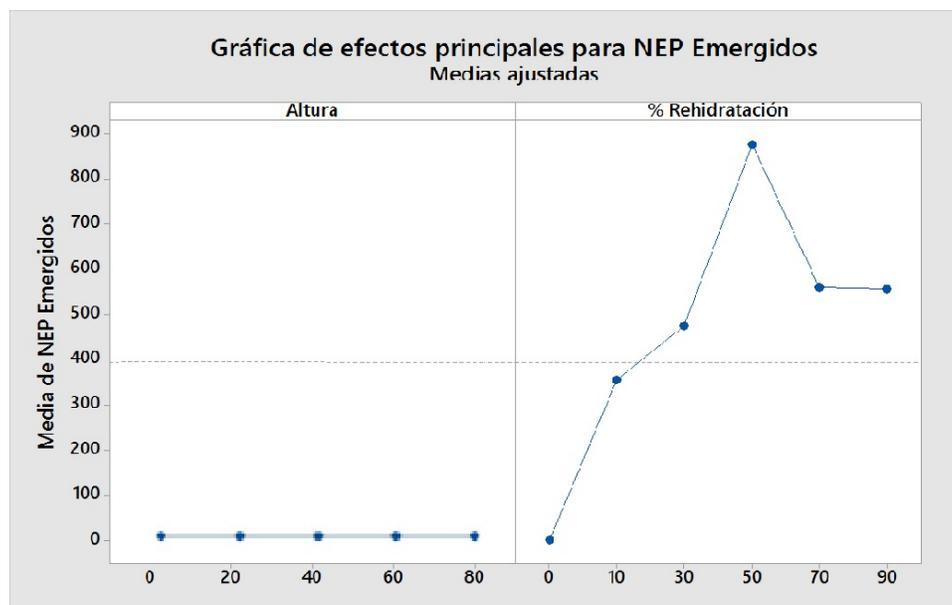


Figura 15. Grafica de los efectos principales vs emergencia de los NEP *S. glaseri*.

Las interacciones que existe entre los dos factores del diseño experimental sobre la emergencia de los NEP (Figura 16), el tratamiento que mayor emergencia registró fue la interacción de una energía de disgregación mecánica de 0.6 m y una rehidratación del pellet del 50% obteniendo una emergencia de 1016.11 NEP, siendo así que la energía de disgregación mecánica que al interactuar con la rehidratación del pellet mayor número de NEP emergidos obtuvo fue de 0.6 m el porcentaje de rehidratación del pellet clave para la reactivación de los NEP dentro del pellet y su posterior emergencia es el 50%.

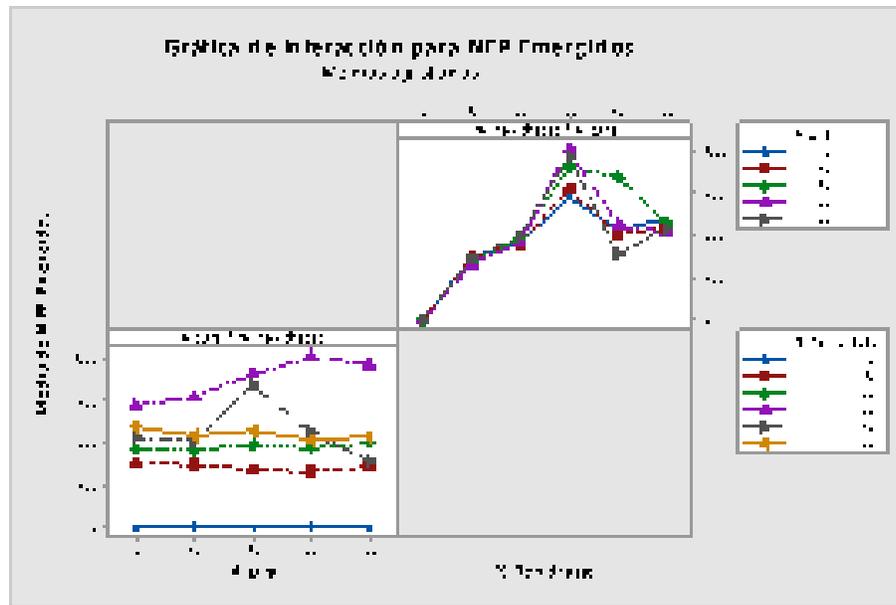


Figura 16. Grafica de la interacción entre la energía de disgregación mecánica y rehidratación del pellet en la emergencia de los NEP *S. glaseri*.

Analizando las Figuras 15 y 16 por separado se comprueba que el provocar primero una disgregación mecánica al pellet ayuda a este a que el número de NEP que emerjan del pellet sea mayor, refiriéndose solo al factor porcentaje de rehidratación del pellet se obtiene una emergencia de 875.88 NEP que es menor en comparación de los 1016.11 NEP que emergencia cuando interactúan los factores de energía de disgregación mecánica primero y posteriormente la de rehidratación del pellet.

4.6 EFECTO DE LA DISGREGACIÓN MECÁNICA Y REHIDRATACIÓN DEL PELLE EN LA INFECTIVIDAD Y PATOGENICIDAD DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS *Steinernema glaseri*.

En el desarrollo de una formulación un factor importante es la conservación de la capacidad infectiva de los NEP encapsulados. Al demostrar que es posible una emergencia total de los NEP sin una disgregación total por rehidratación del pellet la cual a la vez interactúa con una disgregación mecánica es necesario evaluar un posible efecto negativo de los NEP en el proceso de emergencia. Para evaluar la infectividad

de los NEP después de su emergencia se utilizó una energía de disgregación de 0.6 m interactuando con tres porcentajes de rehidratación del pellet los cuales fueron 10%, 50% y 90%. Se utilizaron larvas del último instar de *Galleria mellonella*. Los resultados para la evaluación de la infectividad con larvas de *Galleria mellonella* se muestran en las Figura 17 donde el mayor porcentaje de infectividad lo obtuvo el tratamiento de una disgregación mecánica de 0.6 m y un porcentaje de rehidratación del pellet del 50% alcanzando una infectividad del 95%, seguido por un porcentaje de rehidratación del pellet del 90% y por ultimo de 10% con una infectividad del 60% y 50%.

El ANOVA demostró que no hay diferencia significativa en la infectividad de los NEP *S. glaseri* para los dos últimos tratamientos de 10% y 90% de rehidratación del pellet. Con estos resultados queda demostrado que la capacidad infectiva de los NEP no es afectada por la disgregación mecánica del pellet debido a la energía de impacto ni por la rehidratación que sufre el pellet, si no que la diferencia que existe en el porcentaje de infectividad en los tratamientos se debe al número de NEP que emergieron del pellet.

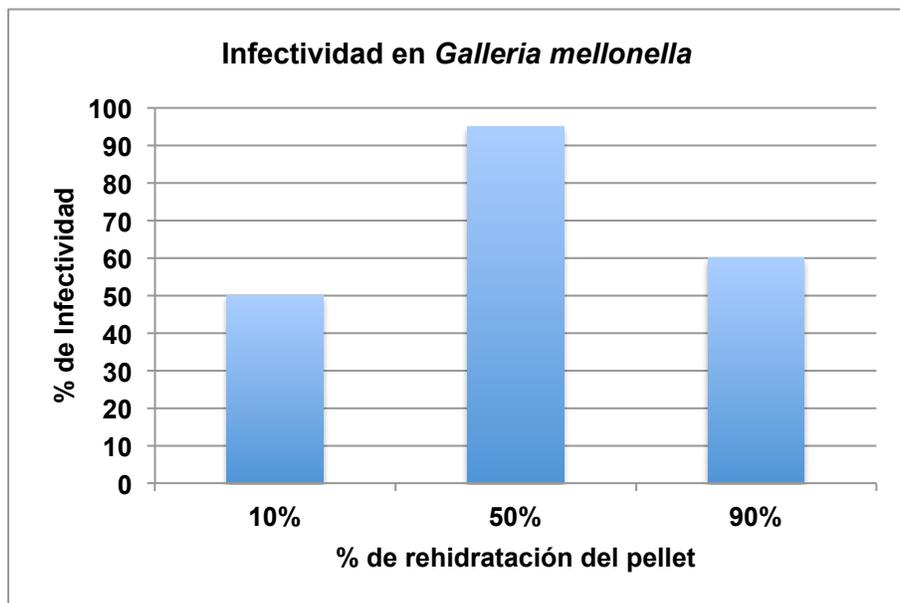


Figura 17. Porcentaje de infectividad de los NEP *S. glaseri* emergidos del pellet vs larvas del último instar de *Galleria mellonella*.

Una vez demostrado que los NEP no sufren daño alguno en su capacidad infectiva se realizó una prueba de patogenicidad sobre larva del tercer estadio de *Phyllophaga spp.* Los porcentajes de efectividad se muestran en la Figura 18.

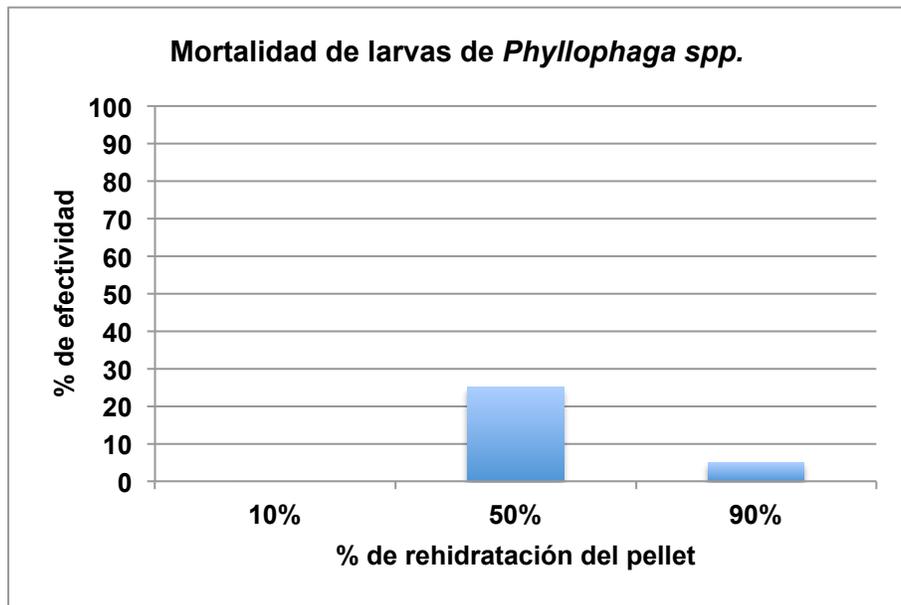


Figura 18. Porcentaje de mortalidad de los NEP *S. glaseri* emergidos del pellet vs larvas del tercer estadio de *Phyllophaga spp.*

El mayor porcentaje de mortalidad fue del 25% correspondiente a una rehidratación del 50%, seguido con una rehidratación del 90% con una mortalidad del 5% ambos tratamientos con una disgregación mecánica de 0.6 m. Para el caso de una rehidratación del pellet del 10% la emergencia de NEP *S. glaseri* no fue capaz de matar a la larva de *Phyllophaga spp.*

CAPITULO 5

DISCUSIÓN

5.1 DISGREGACIÓN POR REHIDRATACIÓN DEL PELLETT.

El incremento en el comportamiento de la masa y los μL de agua absorbidos por pellet en los tres primeros T_p en la cámara nebulizadora de 10, 20 y 30 seg, es debido a las propiedades de la TD, (i) en menor medida a una débil capacidad adsorbente, y (ii) a su excelente poder de absorción (Wen-Tien et al, 2006) con lo que obtiene una masa máxima de $0.65 \pm 3\text{g}$ haciéndose necesario más de $324.28 \pm 3.56 \mu\text{L}$ de agua para disgregarse sólo por el efecto de la rehidratación, siendo esta una gran cantidad de agua tomando como base la masa del pellet, sin embargo es cantidad de agua mucho menor por lo reportado por Connink et al (1994) los cuales disgregan una formulación granular con 10 mL de agua. Pasando el T_p en la cámara nebulizadora de 30 seg se aprecia la existencia de la disgregación del pellet debida a una sobrecarga de agua en los macro y micro poros provocando la dispersión de las partículas de TD (Rivas-Mercury, 2006), es después de este punto donde existe una falla microestructural del pellet. Refiriéndose al apartado 2.6 se puede decir que el pellet pasa de un estado sólido a comportarse como un fluido.

5.2 CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DEL PELLETT

La CA máxima de agua que tiene el pellet antes de disgregarse por rehidratación es igual a 90.92 % de su peso en agua, afirmando así que la TD que es el material granular para la elaboración de los pellets es un material adsorbente y absorbente el cual es capaz de retener un alto contenido de agua (Day, 1995) debido a su estructura macroporosa fina (Wen-Tien et al, 2006). Estos resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Zhang et al, (2013), quienes realizaron pruebas de absorción de seis muestras de TD de la región Tengchong de la provincia de Yunnan, suroeste de China los cuales oscilan entre 84.86% y 113.25%. La CA máxima de agua del pellet es del 90.92% quedando este porcentaje dentro del rango obtenido por Zhang et al, (2013). En la presente investigación se confirma que debido a las propiedades absorbentes de la TD la cual tiene como objetivo primordial secar la cutícula altamente hidratada de los

NEP y con ello provocar que entren en un estado parcial de anhidrobiosis, es la misma propiedad que ocasiona que el pellet tenga un gran porcentaje de CA.

5.3 COHESIÓN MICROESTRUCTURAL DEL PELLET.

El comportamiento de la σ_c del pellet (Figura 14 y 15) es semejante a lo reportado por la literatura (Nichols, 1931; Mullins y Panayiotopoulos, 1984), quienes afirman que la σ_c de un material arcilloso aumenta conforme se incrementa su humedad y disminuye drásticamente al seguirla aumentando. En el caso particular del pellet al ser elaborado de TD el cual es un material arcilloso (Zhang et al, 2013) se rehidrata hasta alcanzar su máxima σ_c la cual se atribuye al acomodo de las partículas de sílice de la cual está compuesta en un 87.6% la TD (Mayolo, 2012), a su elevada reactividad con el agua y a su capacidad para formar fases líquidas de elevada viscosidad mejorando propiedades tales como la porosidad y la resistencia mecánica del material (Rivas-Mercury et al, 2003b). Pasando este punto en donde la película de agua que rodea a las partículas de TD se incrementa, lo que produce que las fuerzas electrostáticas y los puentes de hidrogeno existentes en el pellet (Skubiszewska-Zieba et al, 2012) se rompan, ocasionado una pérdida de cohesión del material granular convirtiendo las partículas de TD en una arcilla floculada y viscosa (Pimraksa y Chindaprasir, 2009).

La σ_c máxima del pellet es de 0.81 g/mm^2 equivalentes a 7.94 MPa correspondientes a una rehidratación del 57.57%, este porcentaje de rehidratación es cercano a lo mencionado por Pimraksa y Chindaprasir (2009) quienes elaboran ladrillos a base TD con una resistencia al corte máxima de 14.5 MPa en un porcentaje de rehidratación del 50%. Sin embargo la σ_c entre los pellets y los ladrillos no se asemejan esto debido a que los ladrillos fueron sometidos a un calentamiento en autoclave a $0,14 \text{ MPa}$ y $130 \text{ }^\circ\text{C}$ en un ambiente de vapor saturado durante cuatro horas lo que explica una σ_c mayor a la de los pellets. En la Figura 15 se aprecia que el pellet alcanza su σ_c máxima en T_p en la cámara nebulizadora de 20 seg siendo estadísticamente igual a T_p de 30 seg (Cuadro 3), sin embargo los μL de agua absorbidos por el pellet difieren

siendo de $190.2 \pm 5.88 \mu\text{L}$ para un T_p de 20 seg y de $326.2 \pm 13.66 \mu\text{L}$ para un T_p de 30 seg, una explicación a este fenómeno sería que los materiales de diatomea utilizados como absorbentes técnicos tienen una estructura altamente porosa (Al-Degs et al, 2001) conteniendo macroporos formados por las micropartículas relativamente grandes obteniendo una porosidad primaria y microporos formados por las micropartículas más pequeñas consiguiendo así una porosidad secundaria (Skubiszewska-Zieba et al, 2012) es así que para T_p de 20 seg los μL de agua absorbidos cubren la porosidad primaria y en T_p de 30 seg los μL restantes llenan los poros secundarios teniendo así la misma C para ambos puntos pero con distintas cantidades de μL de agua absorbidos.

5.4 DISGREGACIÓN MECÁNICA DEL PELLET.

En la relación de disgregación granular obtenida en las dos primeras energías de impacto de 0.2 y 0.4 m no existe una diferencia significativa y ambas son cercanas a 1, diciendo así que el pellet no sufre una alta disgregación mecánica debido a que en el momento de choque es capaz de resistir la energía de impacto gracias a las propiedades granulares de la TD donde la energía de impacto es absorbida por el pellet sin sufrir daño alguno como consecuencia de (i) la vibración almacenada en las partículas de TD luego de la colisión, (ii) a la deformación plástica de la TD y (iii) a las características vico-elásticas de la partícula y la superficie (Vargas et al, 2006).

A pesar de existir una diferencia significativa en las energías de impacto de 0.6 y 0.8 m, la proximidad de la relación de disgregación granular puede ser explicada a que lo que se disgrega por impacto es el material de TD que recubre al núcleo del pellet, el cual es la parte donde se alojan los NEP, y a tener mayor humedad que el material de TD que lo recubre tiene mayor cohesión y por lo tanto es capaz de absorber la energía producida en el impacto. Los resultados demuestran que para la aplicación de los pellets es necesario una energía de impacto mínima de 0.6 m para que la energía potencial convertida en cinética a la hora de dejar caer el pellet ocasione una disgregación mecánica ayudando a que la reactivación de los NEP se mucho más rápida.

5.5 EMERGENCIA DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS *Steinernema glaseri*.

La Figura 17 demuestra la disgregación mecánica del pellet por sí sola no ocasiona ninguna emergencia significativa de NEP ya que es necesariamente una rehidratación previa de los NEP para reactivar sus funciones de búsqueda (Kaya et al, 1987; Koppenhöfer et al, 1995) y como consecuencia su emergencia del pellet. En la misma grafica se observa que una rehidratación mínima de 10% del pellet existe ya un emergencia de NEP, este porcentaje es aún más bajo que lo reportado por Kung et al, (1991), quienes reactivan NEP *S. glaseri* con una humedad del 16% en un suelo franco arenoso en ensayos de laboratorio.

Una rehidratación del pellet del 50% sin la interacción de la disgregación mecánica fue el tratamiento donde el mayor número de NEP emergieron con un total de 879.25 NEP, sin embargo una rehidratación mayor da como resultado una emergencia de NEP menor, considerando que se esperaría que la emergencia de NEP aumentara, una explicación a este fenómeno es que el núcleo contenedor de NEP está sumamente hidratado lo que ocasiona que los NEP en vez de emerger se aglomeren en el núcleo debido a que las condiciones de alta humedad son mayores a las del medio circundante, otro factor que impida la emergencia total de los NEP es la \'C existente en el pellet ya que si se convierte los porcentajes rehidratación del pellet a μL de agua absorbidos se observa que la \'C se alcanza en un rango de absorción de $190.2 \pm 5.88 - 326.2 \pm 13.66 \mu\text{L}$, viendo que la máxima emergencia de los NEP se da en un porcentaje de rehidratación del 50% que es igual a $178.76 \mu\text{L}$, junto antes del rango de absorción donde el pellet alcanza su \'C máxima la cual podría tener un efecto de atrapamiento de los NEP, requiriendo un mayor tiempo para que estos logren vencer esta condición de atrapamiento y emerjan del pellet

La interacción de la disgregación mecánica y rehidratación del pellet da como resultado una mayor número de NEP emergidos siendo de 1016 en comparación de los 879.25 NEP emergidos solo el efecto de la rehidratación del pellet. Una explicación a

este fenómeno sería que el desprendimiento de la TD que rodea al núcleo contenedor de NEP gracias a una disgregación mecánica previa los NEP tienen menores obstáculos que recorrer y por lo tanto la emergencia es en menor tiempo.

El porcentaje de emergencia obtenido con el tratamiento de una energía de disgregación mecánica de 0.6 m y una rehidratación del pellet del 50% fue del 100% siendo mucho mayor por lo reportados por Kaya et al, (1987) quienes encapsularon NEP *S. feltiae* logrando un porcentaje de emergencia del 20%. Hiltpold et al, (2012) encapsulan NEP *Heterorhabditis bacteriophora* obteniendo una emergencia máxima del 73.76%.

5.6 INFECTIVIDAD Y PATOGENICIDAD DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS *Steinernema glaseri*.

La prueba de infectividad sobre las larvas de *Galleria mellonella*, demostró que la disgregación mecánica así como la rehidratación del pellet no tienen un efecto negativo sobre la capacidad infectiva de los NEP. Los distintos porcentajes de infectividad del 50%, 95% y 60% se deben al número de NEP emergidos del pellet y no es atribuida a algún daño ocasionado por la disgregación y rehidratación del pellet sobre los NEP. En lo que corresponde a la prueba de patogenicidad en larvas del tercer estadio de *Phyllophaga spp*, el bajo porcentaje obtenido se puede explicar a que existe un deterioro genético de los NEP *S. glaseri* a ser constantemente reproducidos en larvas de *Galleria mellonella* (Wang y Grewal, 2002), así mismo la energía gastada de los NEP a la hora de la emergencia (Hiltpold et al, 2012) del pellet pudo haber impactado negativamente en la capacidad infectiva de los NEP. Sin embargo, la eficacia de NEP contra los gusanos blancos ha sido variable (Grewal et al, 2005), Sánchez-Saavedra et al, (2012) obtienen un 46% de mortalidad en larvas *Phyllophaga spp.*, con NEP de la especie *Heterorhabditis indica*, mientras que otras investigaciones obtienen porcentajes mayores, Rodríguez et al (2009) logran una mortalidad del 68% en *Phyllophaga elenas* con una sepa de NEP *Heterorhabditis spp*.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

Y

RECOMENDACIONES

Debido a las propiedades absorbentes de la tierra de diatomeas el pellet necesita un nivel de rehidratación mayor a $326.2 \pm 13.66 \mu\text{L}$ de agua equivalentes al 90.90% de su peso en agua. Cabe señalar que este porcentaje es exclusivamente el que necesita el pellet para ser disgregado y será tema de investigaciones posteriores determinar el porcentaje de humedad necesario en el campo para obtener el porcentaje de rehidratación requerido en el pellet para su disgregación.

Al no existir un dispositivo específico para la medición de la cohesión microestructural en pellet, el dispositivo experimental empleado demostró ser útil para analizar el comportamiento de la cohesión microestructural la cual es similar a lo mencionado por la literatura.

Para una posible aplicación en campo de los pellets es necesario una energía de disgregación mínima del 0.6 m es decir de 60 cm para que el pellet se disgregue sin adición de humedad, con lo cual se favorecerá el número de NEP que emerjan de pellet.

Los porcentaje de rehidratación evaluados (10, 30, 50, 70 y 90%) para determinar el número de NEP emergidos del pellet son todos menores a lo requerido por el pellet para su disgregación, con lo cual se comprueba que no es necesario una disgregación por rehidratación total del pellet para provocar la emergencia de los NEP.

Con base a los resultados obtenidos, la emergencia de los NEP *S. glaseri* no es afectada por la disgregación mecánica y si por la rehidratación del pellet, en lo que corresponde a su infectividad y patogenicidad de los NEP *S. glaseri* tanto la disgregación mecánica y la rehidratación no tiene un efecto negativo sobre esta capacidad.

Las investigaciones y tecnologías futuras deberán enfocarse en disminuir el porcentaje de rehidratación que requiere el pellet y los NEP para la emergencia y a

evaluar esta tecnología de liberación obtenida en una aplicación en campo, en donde los factores bióticos y abióticos no pueden ser controlados.

Se recomienda la reactivación periódica de la cepa de *Steinernema glaseri* almacenada en el laboratorio, ya que puede haber perdido virulencia al usarse continuamente sobre *G. Mellonella*.

REFERENCIAS

- Al-Degs, Y., Khraisheh, M.A.M. & Tutunji, M.F. (2001). Sorption of lead ions on diatomite and manganese oxides modified diatomite. *Wat, Res*, 35, 3724-3728.
- Aryaei, A., Hashemnia, K. & Jafarpur, K. (2010). Experimental and numerical study of ball size effect on restitution coefficient in low velocity impacts. *International Journal of Impact Engineering*, 37, 1037-1044.
- Bedding, R.A. (1988). Storage of insecticida nematodes. *World patent* No.WO 88/08668.
- 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., y Merlo, F.D. (2011). Pesticides: Human Health Effects. In: O.N. Jerome (Ed.), *Encyclopedia of Environmental Health*. (pp. 438-453). Burlington: Elsevier.
- Burnell, A. M., & Stock, P. (2000). *Heterorhabditis, Steinernema* and their bacterial symbionts lethal pathogens of insects. *Nematology*, 2(1), 31-42.
- Chen, S. & Glazer, I. (2005). A novel method for long-term storage of the Entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* at room temperature. *Biological Control*.32, 104–110.
- Clare, E. K., (2004). *The influence of the clay fraction on the engineering properties of soil, with some suggestion for future research*. Road Research Laboratory, Harmondsworth, Middlesex.
- Connick, W.J., Nickle, W.R., Williams, K. S. & Vinyard, B. T. (1994). Granular Formulations of *Steinernema carpocapsae* (strain All) (Nematoda: Rhabditida) with Improved Shelf Life. *Journal of Nematology*. 26(3), 352-359.
- Cruz-Martínez, H. (2013) Efecto del recubrimiento del pellet en la supervivencia del nematodo entomopatógeno *Steinernema glaseri* encapsulado mecánicamente. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Davis, C.C., (1993). Environmental concerns about pesticide use in Philippine agriculture. *The Science of the Total Environment*, 293-305.

- Day, R.B., 1995. Engineering properties of diatomaceous fill. *J. Geotech. Eng. Div. Am. Soc. Civ. Eng.* 121, 908–910.
- De Bach, P. (1964), *Biological control of insect pests and weeds*, New York: Reinhold.
- Del Rincón, C. MC., (2012). XXV Congreso Nacional de Control Biológico y XXII Curso Nacional de Control Biológico, Puebla, noviembre.
- Dhaliwal, G.S., Jingal, V., & Dhawan A.K. (2010). Insect Pest Problems and Crop Losses: Changing Trends. *Indian Journal of Ecology*, 37(1), 1 - 7.
- Espinosa R. M. (2005). *Diseño de una máquina para encapsular nematodos Entomopatógenos*. Tesis de Ingeniero Mecánico Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo, México.
- García Del Pino, F. (1996). Los nematodos entomopatógenos, agentes de control de plagas. En: J. Jacas, P. Caballero & J. Ávila (Eds.), *Morfología del nematodo: control biológico de plagas y enfermedades* (pp. 87-114). Castelló de la Plana: Publicaciones de la Universitat Jaume I.
- 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 japónica* Newm.). *Science*, 70:16-17.
- Grewal, P. S. (2000a). Enhanced ambient storage stability of an Entomopathogenic nematode through anhydrobiosis. *Pest Management Science*, 56, 401-406.
- Grewal, P. S. (2000b). Anhydrobiotic potential and long-term storage of Entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). *International Journal for Parasitology*, 30, 995-1000.
- Grewal, P.S. (2002). Formulation and application technology. In: R. Gaugler (Ed.), *Entomopathogenic Nematology* (pp. 265–287). Wallingford: CABI Publishing.
- Grewal, P.S., Ehlers, R.U., Shapiro-Ilan, D. (2005) Nematodes as Biocontrol Agents (pp. 115–146), Wallingford, UK: CABI Publishing.

- Han, L.B., An, Q., Lou, S.N. & Goddard II, W.A., (2010). Ultra-elastic and inelastic impact of Cu nanoparticles. *Materials Letter*, 64, 2230-2232.
- Hayakawa, H., & Kunina, H. (2002). Simulation and theory of the impact of two-dimensional elastic disks. *Chemical Engineering Science*, 57, 239-252.
- Hiltbold, I., Hibbard, B. E., Wade, B. F. & Turlings, T.C. J. (2012). Capsules containing Entomopathogenic nematodes as a Trojan horse approach to control the western corn rootworm. *Plant Soil*. 358, 11-25.
- Jenike, A. W. (1964). Steady gravity flow of frictional-cohesive solids in converging channels. *Journal of Applied Mechanics*, 31, 5.
- Jinsheng Fu., Reynolds G. K., Adams, J. M., Hounslow, J. M., and Salmon, D. A., (2005). An experimental study of the impact breakage of wet granules, *Chemical Engineering Science*, 60, 4005-4018.
- Juárez, B. E. & Rico, R. A., (2006). *Mecánica de suelos*. (pp. 41-42) México: Limusa.
- Kaya, H. K., Mannion, C. M., Burlando T. M. & Nelsen, C. E. (1987). Escape of *Steinernema feltiae* from Alginate Capsules Containing Tomato Seeds. *Journal of Nematology*. 19(3), 287-291.
- Kaya, H. K. & Nelsen, C. E. (1985). Encapsulation of *Steinernematidae* and *Heterorhabditis* Nematodes with Calcium Alginate: A New Approach for Insect Control and Other Applications. *Environmental Entomology*. 14, 572-574.
- Kaya, H. K. & S. P. Stock. (1997). Techniques in insect nematology. In L. A. Lacey (Ed), *Manual of Techniques in Insect Pathology*. (pp. 281-324). London: Academic Press.
- Koppenhöfer, M.A., Kaya, H.K. & Taormino, P. S. (1995). Infectivity of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida:Steinernematidae) at Different Soil Depths and Moistures. *Journal of Invertebrate Pathology*, 65, 193-199.
- Kung, S. P., Gaugler, R., & Kaya, H. K. (1991). Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on Entomopathogenic nematode persistence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 57(2), 242-249.
- Liang, R., Liu, M., and Wu L. (2007). Controlled releases NPK compound fertilizer with the function of water retention. *Reactive & Functional Polymers*, 67, 769-779.

- Mannion, M. C., and Jansson K. R. (1992). Movement and Postinfection Emergence of Entomopathogenic Nematodes from Sweetpotato Weevil, *Cylas formicarius* (F.) (Coleoptera: Apionidae). *Biological Control*, 2, 297 – 305.
- Martínez P. A., Plaguicida Biológico a base de quitosano. España. (Cl. ES. 01/00429), 10 Noviembre 2000, P. 200002708. 28 p.
- Matadamas-Ortiz, P.T., Ruiz-Vega, J., Vázquez-Feijoo, J.A., Cruz-Martinez, H., and Cortés-Martinez, C.I. (2014). Mechanical production of pellets for the application of Entomopathogenic nematodes: factors that determine survival time of *Steinernema glaseri*. *Biocontrol Science and Technology*, 2, 297-305.
- Mendoza-Pérez, M. (2012). Efecto de la dureza del pellet en la mortalidad del nematodo entomopatógeno *Steinernema glaseri* encapsulado mecánicamente. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Mullins, C.E. & Panayiotopoulos, K.P. (1984) The strength of unsaturated mixtures of sand and kaolin and the concept of effective stress. *Journal of Soil Science*, 35, 459-468.
- 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.
- Nichols, M.L. - 1931. The Dynamic Properties of Soil. An Explanation of the Dynamic Properties of Soils by means of Colloidal Films. *Agr. Eng.*, 12: 259-264.
- NOM-037-FITO-1995 (1995). Por la que se establecen las especificaciones del proceso de producción y procesamiento de productos agrícolas orgánicos.
- Rivas Mercury, J.M., Turrillas, X., De Aza, A. H. & Pena, P. (2006). Calcium aluminates hydration in presence of amorphous SiO₂ at temperatures below 90 °C. *Journal of Solid State Chemistry*, 179, 2988–2997.
- Rodríguez, D., Torres, M., Uribe, L. & Flores, L. (2009). Susceptibilidad de los estadios L2 y L3 de *Phyllophaga elenans* a una cepa nativa de *heterorhabditis* sp. en condiciones de invernadero. *Agronomía Costarricense*, 33(2), 171-182.

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.

Pimraksa, K. & Chindaprasirt, P. (2009) Lightweight bricks made of diatomaceous earth, lime and gypsum. *Ceramics International*, 35, 471–478.

Pusch., R. (1979) Cohesion in fine-grained soils, In K.E. Easterling (Ed), *Mechanisms of Deformation and Fracture*. (pp.137-144). Sweden: Pergamon

SAGARPA. 2010. Síntesis del Sector Agropecuario de Oaxaca. Dirección General de Estudios Agropecuarios y Pesqueros. México. Consultado el día 17 de enero de 2011. http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Estadisticas/Documents/OAXACA.pdf?Mobile=1&Source=%2Fagronegocios%2FEstadisticas%2F_layouts%2Fmobile%2Fview.aspx%3List%3Dea4191c6-15b5-25afe9be7e6cce2216%26View%3Df5c8d1753fb9-49f2-86e6c9db05b29bf%26CurrentPage%3D1

San-Blas, E. (2012). Progress on Entomopathogenic nematology research: A bibliometric study of the last three decades: 1980-2010. *Biological Control*, 66, 102-124.

Sánchez-Saavedra, M.G., Cortez-Madrigal, H. & Cristobal-Acevedo, D. (2012). Infectividad de heterorhabditis indica (rhabditida: heterorhabditidae) en adultos y larvas de gallina ciega (coleoptera: melolonthidae). *Chapingo serie horticultura*, 8 (3), 383-394.

Skubiszewska-Zieba, J., Charmas, B., Leboda, R. & Gun'ko, V.M. (2012). Carbon-mineral adsorbents with a diatomaceous earth/perlite matrix modified by carbon deposits. *Microporous and Mesoporous Materials*. 156, 209–216.

Shapiro-Ilan, D. I., Gouge, D. H., Piggott, S. J., & Fife, J. P. (2006). Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biological Control*, 38, 124-133.

Shapiro-Ilan, D. I., Lewis, E. E., Son, Y., & Tedders, W. L. (2003). Superior efficacy observed in entomopathogenic nematodes applied in infected-host cadavers compared with application in aqueous suspension. *Journal of Invertebrate Pathology*, 83, 210-272.

- Shapiro-Ilan, D. I., Lewis, E. E., Campbell, J. F., and Kim-Shapiro, D. B. (2012). Directional movement of entomopathogenic nematodes in response to electrical field: effects of species, magnitude of voltage, and infective juvenile age. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(1), 34-40.
- Silver, S. C., Dunlop, D. B., and Grove, D. I. (1995). Granular formulations of biological entities with improved storage stability, World Patent No 95/0577.
- 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: Talleres Gráficos Mariano Más.
- Reyes, L. J. (2012). Construcción de una cámara de nebulización para el recubrimiento superficial del pellet. *Memoria de residencia*. Instituto Tecnológico de Oaxaca. México.
- Vargas, W.L., Pineda, L.M. & Murgia, J.C. (2006). Impacto inelástico de una partícula sobre una superficie. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, 16 (1), 80-91.
- Wang, X. & Grewal, P.S. (2002). Rapid genetic deterioration of environmental tolerance and reproductive potential of an entomopathogenic nematode during laboratory maintenance. *Biological Control*, 23, 71–78
- Wen-Tien, T., Chi-Wei, L. & Kou-Jong, H. (2006). Characterization and adsorption properties of diatomaceous earth modified by hydrofluoric acid etching. *Journal of Colloid and Interface Science*, 297, 749–754.
- 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: Academic Press.
- Zhang, Y., Gou, C., Yao, X., Qu, Y. & Zhou, N. (2013) Engineering geological characterization of clayey diatomaceous earth deposits encountered in highway projects in the Tengchong region, Yunnan, China. *Engineering Geology*, 167, 95-104.