



# Instituto Politécnico Nacional

Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional

Unidad Oaxaca

DOCTORADO EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES

## “Diseño de Reservorios Microestructurados para Nematodos Entomopatógenos *Steinernema glaseri* como Agentes de Control Biológico”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

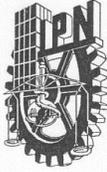
Carlos Inocencio Cortés Martínez

DIRECTOR:

Dr. Jaime Ruiz Vega

Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca.

Mayo, 2016.



# 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 12 del mes de mayo del 2016 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: **“Diseño de Reservorios Microestructurados para Nematodos Entomopatógenos *Steinernema glaseri* como Agentes de Control Biológico**

Presentada por el alumno

**Cortés**

Apellido paterno

**Martínez**

materno

**Carlos Inocencio**

nombre(s)

Con registro: 

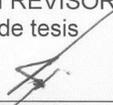
B	1	2	0	2	2	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de: **DOCTORADO 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.

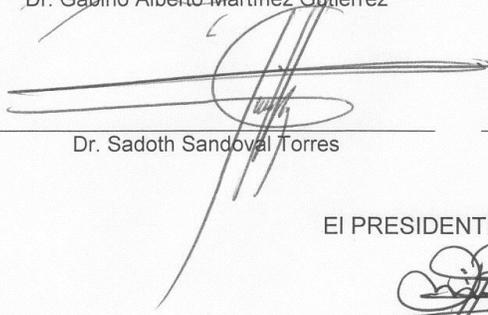
LA COMISION REVISORA

Director de tesis

  
Dr. Jaime Ruiz Vega

  
Dr. Gabino Alberto Martínez Gutiérrez

  
Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez

  
Dr. Sadoth Sandoval Torres

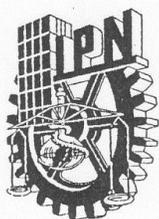
  
Dr. Teodulfo Aquino Bolaños

EI PRESIDENTE DEL COLEGIO

  
Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez



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



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESION DE DERECHOS**

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 12 del mes mayo del año 2016, el (la) que suscribe Cortés Martínez Carlos Inocencio alumno (a) del Programa de **DOCTORADO EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro B120220, 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 del Dr. Jaime Ruiz Vega y cede los derechos del trabajo titulado: **“Diseño de Reservorios Microestructurados para Nematodos Entomopatógenos *Steinernema glaseri* como Agentes de Control Biológico”**. 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](mailto:posgradoax@ipn.mx) ó [solemia7@hotmail.com](mailto:solemia7@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.

  
Cortés Martínez Carlos Inocencio

Citar como:

Cortes-Martínez, C. I. (2016). Diseño de Reservorios Microestructurados para Nematodos Entomopatógenos *Steinernema glaseri* como Agentes de Control Biológico. Tesis de Doctorado. Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Unidad Oaxaca. México.

## RESUMEN

La formulación de nematodos entomopatógenos (NEP) es el proceso de transformar juveniles infectivos (JI) en un bioplaguicida para usarse en el control biológico. En laboratorio, *Steinernema glaseri* es el NEP que causa mayor mortalidad en poblaciones de larvas de *Phyllophaga vetula*, un insecto plaga que reduce la calidad y rendimiento del cultivo de maíz (*Zea mays*). El pellet de tierra diatomea (TD) logra mantener JI viables a temperatura ambiente por 14 días, pero su patogenicidad sobre este insecto no ha sido determinada. Los objetivos fueron: analizar la pérdida de humedad del pellet de TD a temperatura ambiente ( $23 \pm 3^\circ\text{C}$ ) y sus efectos en la supervivencia de *S. glaseri* y la infectividad sobre larvas de *Galleria Mellonella*, evaluar la influencia del envejecimiento y la preaclimatación de los JI en la supervivencia y la infectividad sobre *P. vetula* y determinar las especificaciones de ingeniería para rediseñar el pellet y mejorar su desempeño durante el almacenamiento a temperatura ambiente y el control de *P. vetula*. Se encontró que el transporte de humedad desde el pellet hacia la atmosfera circundante se explica por las teorías de evaporación y convección y el transporte de humedad en la microestructura del pellet por la teoría de difusión molecular. La pérdida acelerada de humedad de los pellets reduce la supervivencia de los JI y una baja tasa de supervivencia disminuye la infectividad sobre *G. mellonella*. El envejecimiento de los JI por la permanencia en el agua de la trampa White en un periodo de 7 días no tuvo un efecto significativo en la infectividad sobre *P. vetula*, pero en cuanto a la penetración, las diferencias significativas fueron entre los días de envejecimiento 1 contra 4, 6 y 7. La mayor mortalidad de *P. vetula* observada es aplicando  $1000 \pm 50$  JI de 3 a 5 días de envejecimiento. La preaclimatación se realizó colocando los hospederos infectados en cajas Petri con una capa de yeso Paris levemente húmeda para que los JI emergentes se movieran en dirección del agua. Con este tratamiento mejoró la supervivencia en pellets de TD, pero la infectividad sobre *P. vetula* es mediocre, estos resultados sugieren que los JI estaban preparados para tolerar la desecación en TD pero el tiempo de rehidratación fue insuficiente para reactivar su capacidad infectiva después de la anhidrobiosis parcial. Las especificaciones de ingeniería de mayor importancia relativa para rediseñar el pellet fueron: aumentar el tiempo de supervivencia de los JI a  $\geq 3$  meses, mantener la tasa de supervivencia de los JI a  $\geq 0.9$ , aumentar el porcentaje de infectividad sobre el insecto plaga a  $\geq 90\%$  y reducir el tiempo para causar la muerte de *P. vetula* a  $\leq 4$  días. Otras especificaciones de menor importancia como la adición en el pellet de lípidos para mantener sus funciones vitales y fagoestimulantes para aumentar la interacción del JI con el insecto plaga, estarían correlacionados con la supervivencia e infectividad, respectivamente, y podrían contribuir a mejorar la funcionalidad de los pellets y la efectividad de los JI para el control de *P. vetula*.

Palabras clave: pellets, bioplaguicida, *Phyllophaga vetula*, humedad, modelación.

## ABSTRACT

The formulation of entomopathogenic nematodes (EPN) is the process of transforming infective juveniles (IJ's) in a biopesticide to use them in biological control. In lab, *Steinernema glaseri* is the EPN that has caused the major mortality of *Phyllophaga vetula* populations, an edaphic insect-pest that reduces the quality and yield of maize (*Zea mays*) plantations. The diatomaceous earth (TD) pellet has maintained IJ's viability at room temperature for 14 days, but their pathogenicity on this insect has not been determined. The objectives were: to analyze the moisture loss from DE pellet at room temperature ( $23 \pm 3^\circ\text{C}$ ) and its effects in *S. glaseri* survival and infectivity on *Galleria mellonella* larvae, to evaluate the influence of aging and preacclimation of IJ's in survival and infectivity on *P. vetula* and to determine engineering specifications to redesign of the pellet and improve their performance during storage at room temperature and control of *P. vetula*. It found that the moisture transport from DE pellet to the surrounding atmosphere is explained by evaporation and convection theories and the moisture transport into the pellet's microstructure by molecular diffusion theory. The faster moisture loss from pellet reduces the survival of IJ's, and a low IJ's survival rate decreases the infectivity on *G. mellonella*. The aging of IJ's by their permanency in White trap's water in an period of 7 days had no significant effect in their infectivity on *P. vetula*, but in relation to penetration rate, the significantly differences were between the aging days 1 vs 4, 6 and 7. The preacclimation of IJ's is performed by placing infected hosts in Petri dishes lined with a layer of plaster of Paris slightly moistened to the emerging IJ's move toward the water. With this treatment the IJ's survival in DE pellets is improved, but their infectivity on *P. vetula* larvae is very poor, these results suggest that they were prepared for tolerate desiccation in DE pellet but the rehydration time is not enough to reactivate its infectivity after partial anhydrobiosis. Engineering specifications of major relative importance to redesign the pellet were: increase the survival time of the JI to  $\geq 3$  months, maintain the survival rate of JI to  $\geq 0.9$ , increase the percentage of infectivity of the insect pest  $\geq 90\%$  and reduce the time to cause the death of *P. vetula* to  $\leq 4$  days. Other specifications of minor importance as addition in the pellet of lipids to maintain their vital functions and feeding stimulants to increase the interaction IJ's-insect pest could be correlated with the IJ's survival and the infectivity percentage, respectively, and could contribute to improve the pellet's functionality and IJ's effectivity for the control of *P. vetula*.

Keywords: pellets, biopesticide, *Phyllophaga vetula*, moisture, modelation.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al instituto Politécnico Nacional, por los recursos materiales, infraestructura y personal académico provistos para realizar esta investigación.

Al Dr. Jaime Ruiz Vega y al Dr. Pastor Teodoro Matadamas Ortiz, por el tutelaje y apoyo recibido durante mi preparación académica y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el financiamiento otorgado durante el periodo de estudios a través de la beca no. 209379.

Al Programa Beca Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) del IPN, por el estímulo económico recibido durante el proceso de mi formación académica como Doctor en Ciencias, a través de la participación en el proyecto de investigación: “Estudio de la efectividad de formulaciones de hongos y nematodos entomopatógenos para el control de insectos de importancia agrícola en Oaxaca”, Clave SIP: 20160475, dirigido por el Dr. Jaime Ruiz Vega.

Al Dr. Edwin E. Lewis, profesor de la Universidad de California, Davis, Davis CA. EUA. Por las facilidades otorgadas para realización de experimentos en su Laboratorio.

A los integrantes del Comité Revisor y Jurado de Examen: Dr, Gabino Alberto Martínez Gutiérrez, Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez, Dr. Jaime Ruiz Vega, Dr. Sadoth Sandoval Torres y Dr. Teodulfo Aquino Bolaños.

Al Dr. Carlos Martínez Álvarez y al M. I. José Navarro Antonio por su colaboración para la revisión crítica durante el desarrollo de esta investigación.

## **DEDICO ESTA TESIS A:**

Dios, por esta nueva oportunidad para crecer, bajo su protección y cuidado. Aleida Deni y Caleb, por su valiosa compañía, amor y confianza. Mis familiares, por su apoyo y comprensión. Mis amigos, por su valioso consejo y ayuda. Ing. Cayetano Serrano Blanco†, por los consejos.

## CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	4
JUSTIFICACIÓN .....	6
OBJETIVO GENERAL.....	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	8
CAPÍTULO 1 Generalidades .....	9
1.1. Nematodos Entomopatógenos .....	9
1.2. Nematodos juveniles infectivos.....	9
1.3. Formulación de NEP .....	10
1.4. Transporte de humedad en las formulaciones granulares.....	12
1.5. Mortalidad de los NEP en pellets de TD .....	13
1.6. Estrategia convencional para formular NEP en gránulos o pellets .....	14
1.7. Ingeniería de pellets con NEP, una estrategia alternativa para el desarrollo de bioplaguicidas granulares.....	16
CAPÍTULO 2 Materiales y Métodos.....	19
2.1. <i>S. glaseri</i> (raza NJ-43).....	19
2.2. Larvas de <i>Phyllophaga vetula</i> .....	19
2.3. Material para la pelletización .....	19
2.4. Cladodios de nopal .....	19
2.5. Propagación de <i>S. glaseri</i> .....	20
2.5.1. En trampa White modificada .....	20
2.5.2. En caja Petri con yeso de Paris .....	20
2.6. Dosificación de <i>S. glaseri</i> .....	20
2.7. Aclimatación de <i>S. glaseri</i> .....	21
2.8. Determinación del contenido de humedad de <i>S. glaseri</i> .....	21
2.9. Pelletización.....	21
2.9.1. Mezclador de vórtice.....	21

2.9.2. Pelletizadora mecánica.....	22
2.10. Almacenamiento de los pellets .....	22
2.11. Determinación del contenido de humedad del pellet.....	22
2.1.2. Recuperación de la movilidad de los JI pelletizados .....	22
2.13. Ensayos de supervivencia de <i>S. glaseri</i> .....	22
2.14. Ensayos de infectividad .....	23
2.14.1. Sobre larvas de <i>G. mellonella</i> .....	23
2.14.2. Sobre larvas de <i>P. vetula</i> .....	23
2.14.3. Penetración de JI .....	23
2.15. Obtención del extracto de nopal <i>Opuntia ficus indica</i> .....	24
2.16. Caracterización reológica del extracto de nopal.....	24
2.17. Preparación de la suspensión acuosa con extracto de nopal.....	24
2.18. Proceso de modelación .....	24
2.19. Determinación del coeficiente de transferencia de masa <b>hm</b> por convección natural.....	25
2.20. Determinación del error de modelación .....	26
2.20.1. Desviación porcentual media relativa .....	26
2.20.2. Raíz del error cuadrático medio .....	26
2.21. Análisis estadístico de los datos .....	26
2.21.1. Supervivencia de los JI .....	26
2.21.2. Infectividad por el envejecimiento de los JI .....	27
2.21.3. Ajuste de datos experimentales a una ecuación de aproximación .....	27
2.22. Proceso de diseño .....	27
CAPÍTULO 3 Análisis del transporte de humedad en pellets de TD.....	28
3.1. Transporte temporal de la humedad por evaporación y difusión .....	28
3.1.1. Resultados .....	28
3.1.2. Discusión.....	30

3.2. Transporte temporal de la humedad por convección natural y difusión.....	32
3.2.1. Resultados .....	33
3.2.2. Discusión.....	37
3.3. Transporte espacial y temporal de la humedad .....	40
3.3.1. Resultados .....	40
3.3.2. Discusión.....	48
<b>CAPÍTULO 4 Evaluación de la pérdida de humedad del pellet con un adyuvante mejorador de la viscosidad y evaluación de la infectividad de juveniles infectivos envejecidos sobre <i>P. vetula</i>.....</b>	<b>51</b>
4.1. Adición de extracto de nopal en la fase líquida y su efecto en la pérdida de humedad de pellets de TD.....	51
4.1.1. Resultados .....	51
4.1.2. Discusión.....	53
4.2. Envejecimiento de <i>S. glaseri</i> y su efecto en la infectividad sobre <i>P. vetula</i> .....	53
4.2.1. Resultados .....	53
4.2.2. Discusión.....	55
<b>CAPÍTULO 5 Evaluación de pellets de TD con nematodos <i>S. glaseri</i>.....</b>	<b>57</b>
5.1. La rápida pérdida de humedad del pellet y su efecto en la supervivencia e infectividad de los JI .....	57
5.1.1. Resultados .....	57
5.1.2. Discusión.....	58
5.2. Preaclimatación de los JI pelletizados y su efecto en la supervivencia y la infectividad sobre <i>P. vetula</i> .....	59
5.2.1. Resultados .....	59
5.2.2. Discusión.....	62
<b>CAPÍTULO 6 Especificaciones de diseño para el desarrollo de un formulado con nematodos <i>S. glaseri</i>.....</b>	<b>66</b>
6.1. Resultados.....	66
6.1.1. Declaración de necesidad.....	66

6.1.2. Análisis de mercado .....	66
6.1.3. Requerimientos de diseño .....	66
6.1.4. Ponderación de la importancia de los requerimientos de diseño .....	68
6.1.5. Árbol de Objetivos .....	69
6.1.6. Diagrama de la función general .....	69
6.1.7. Árbol de funciones .....	70
6.1.8. Estructura funcional .....	70
6.1.9. Especificaciones de ingeniería .....	71
6.2. Discusión .....	72
CONCLUSIONES .....	74
RECOMENDACIONES .....	75
LITERATURA CITADA .....	76
Anexo 1. Propiedades físicas y químicas típicas de la tierra de diatomeas (Celite® 209).	89
Anexo 2. Encuesta de recolección de los requerimientos del usuario .....	90
Anexo 3. Resultados de la encuesta de importancia de los requerimientos .....	91
Anexo 4. Productividad relevante .....	92

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esferas de influencia que representan las consideraciones para el control efectivo de poblaciones de insectos plaga con nematodos entomopatógenos. ....	7
Figura 2. Propuesta de investigación para el desarrollo de la metodología de diseño de reservorios microestructurados para NEP. ....	18
Figura 3. Modelo de transporte de humedad unidimensional en el pellet basado en la condición de difusión y evaporación superficial. ....	29
Figura 4. Comportamiento experimental y pronosticado del contenido de humedad en el pellet y el Control por un modelo de difusión- evaporación a $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y 96-100% HR. ....	30
Figura 5. Modelo de transporte de humedad unidimensional en el pellet basado en la condición de difusión y convección natural. ....	33
Figura 6. Cinéticas de humedad en pellets de TD, almacenados a $23^{\circ}\text{C}$ y 96% HR. Datos experimentales ( $\square$ ) y simulaciones por el modelo evaporativo ( $\circ$ ) y por el modelo difusivo ( $\blacktriangle$ )....	36
Figura 7. Imagen obtenida por microscopia electrónica de barrido del interior de un pellet de TD (Celite <sup>®</sup> 209) elaborado mecánicamente. Imagen reproducida con autorización del autor (Cruz-Martínez, 2010). ....	38
Figura 8. Transferencia de humedad unidimensional en pellets de TD basado en gradientes espaciales de contenido de humedad. ....	41
Figura 9. Código fuente de la programación de las ecuaciones en MATLAB <sup>®</sup> . ....	43
Figura 10. Pronostico de la distribución espacial del contenido de humedad en el pellet en un periodo de 10 días, a $23^{\circ}\text{C}$ y 96% HR. ....	45
Figura 11. Pronostico de la evolución de contenido de humedad en cada uno de los 7 puntos de inspección del pellet, a $23^{\circ}\text{C}$ y 96% HR. ....	45
Figura 12. Cinéticas de contenido de humedad en pellets de TD, experimental y pronosticado por el modelo MTH-AH. $D$ constante, temperatura de $23^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa de 96%. ....	46
Figura 13. Pronostico de la evolución del contenido de humedad por efecto de la porosidad del pellet a $23^{\circ}\text{C}$ y 96% HR. ....	47
Figura 14. Evolución del contenido de humedad por efecto del incremento de la viscosidad de la fase líquida del pellet a $23^{\circ}\text{C}$ y 96% HR. ....	47
Figura 15. Evolución del contenido de humedad por efecto del recubrimiento a temperatura de $23^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa de 96%. ....	48

Figura 16. Curvas de viscosidad para las suspensiones con agua bidestilada y concentraciones del extracto de nopal ( <i>Opuntia ficus indica</i> ) propuestas, a 25 °C.....	51
Figura 17. Evolución del contenido de humedad en pellets elaborados con TD y agua bidestilada con distintas concentraciones de extracto de nopal ( <i>Opuntia ficus indica</i> ) y almacenados a 23 ± 3°C y 96-100% HR.....	52
Figura 18. Contenido de humedad inicial y de equilibrio de pellets elaborados con TD y agua bidestilada con distintas concentraciones de extracto de nopal ( <i>Opuntia ficus indica</i> ) y almacenados a 23 ± 3°C y 96-100% HR. ....	52
Figura 19. Comportamiento de la tasa de penetración de <i>S. glaseri</i> en <i>P. vetula</i> en relación a la edad de los JI.....	54
Figura 20. Mortalidad de las larvas de <i>P. vetula</i> por el enfrentamiento con JI envejecidos. ....	54
Figura 21. Mortalidad de las larvas de <i>P. vetula</i> y tasa de penetración de los JI envejecidos. ....	55
Figura 22. Evolución del contenido de humedad de los pellets con y sin nematodos <i>S. glaseri</i> , almacenados a 23±2 °C y 96-100% HR.....	57
Figura 23. Tasa de supervivencia del <i>S. glaseri</i> en pellets de tierra diatomea, a 23 ± 2°C y 96-100% HR. ....	58
Figura 24. Infectividad de juveniles <i>S. glaseri</i> pelletizados en TD sobre larvas de <i>G. mellonella</i> en un periodo de 10 días a 25 ±1°C. ....	58
Figura 25. Comportamiento temporal del contenido de humedad en pellets de TD con JI colectados de TW o YP. El almacenamiento fue a 21-26°C y 96-100% HR. ....	60
Figura 26. JI emergiendo de hospederos infectados colocados sobre: a) yeso Paris y b) trampa White. ....	60
Figura 27. Supervivencia de <i>S. glaseri</i> mecánicamente pelletizado en TD o concentrados en AB. YP: colectados de yeso Paris y TW: colectados de trampa White. ....	61
Figura 28. Mortalidad de <i>P. vetula</i> por el enfrentamiento con JI cosechados de los tratamientos TW o YP, depositados en AB o pelletizados en TD y el Control. ....	62
Figura 29. Árbol de objetivos de una formulación para <i>S. glaseri</i> . JI: juveniles infectivos, F: formulado. ....	69
Figura 30. Diagrama de la función general del formulado con nematodos <i>S. glaseri</i> . ....	70
Figura 31. Árbol de funciones para un formulado con nematodos <i>S. glaseri</i> . ....	70
Figura 32. Estructura funcional de la formulación de <i>S. glaseri</i> . ....	71

Figura 33. Casa de calidad del formulado con <i>S. glaseri</i> .....	72
Figura 34. Esferas de influencia que representan consideraciones para el diseño de reservorios microestructurados para nematodos <i>S. glaseri</i> .....	73

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ecuaciones de aproximación de los valores de $\beta n$ para $n = 1, 2, 3, 4$ y $5$ y $0 \geq Bim \leq 100$ . .....	35
Tabla 2. Valores diarios del coeficiente de difusión, número de Biot, contenido de humedad pronosticado por el modelo evaporativo y medido experimentalmente en pellets de TD almacenados a $23^{\circ}\text{C}$ , 96% HR y 1 atm de presión. ....	36
Tabla 3. Formulaciones con <i>S. glaseri</i> , método de crianza, condiciones de almacenamiento y tiempo de supervivencia. ....	63
Tabla 4. Lista de requerimientos agrupados por etapas del proceso de formulación.....	67
Tabla 5. Lista de requerimientos de diseño priorizados.....	68

## INTRODUCCIÓN

La formulación de insecticidas microbianos es un proceso que transforma entidades vivientes en un producto que puede ser aplicado por métodos prácticos para explotar su actividad biológica. Mediante la formulación se mejora la estabilidad en almacenamiento de las entidades, se facilita su manejo por los aplicadores y se utilizan de manera más efectiva y segura para proporcionar un control efectivo y económico de los insectos plagas (Táborsky, 1992).

Los nematodos entomopatógenos (NEP) (Nematoda: Heterorhabditidae y Steinernematidae) son agentes eficaces para el control biológico de plagas debido a su facilidad de adaptación al ambiente, su alta letalidad contra las plagas principales e inocuidad (Grewal, 2002). Basado en el principio de la anhidrobiosis en los NEP se emprendió la formulación en gránulos para el almacenamiento a largo plazo, porque en teoría, los materiales que componen la matriz del gránulo absorben el agua de la gota que contiene a los NEP, los desecan gradualmente y así son conducidos a un estado de quiescencia que aumenta su tiempo de supervivencia y conserva sus capacidades infectivas (Hernández, Zamora, González, Salazar, & Sánchez, 2009; San-Blas, 2013).

Silver et al. (1995) afirmó que este proceso de desecación es controlado mediante una selección apropiada de los materiales portadores, los adyuvantes añadidos a la formulación y el método de elaboración del gránulo. Grewal (2002) encapsuló nematodos *Steinernema carpocapsae* basado en la patente de Silver et al. (1995) y registró un decremento en el consumo de oxígeno y lípidos e incremento en el tiempo de supervivencia, llegando hasta 7 meses bajo condiciones de almacenamiento estables a 25 °C, demostrando que la inducción a la anhidrobiosis en formulaciones granulares incrementa la longevidad de los JI de *S. carpocapsae*.

La inducción a un estado de anhidrobiosis puede ser el mecanismo biológico más influyente para mantener las capacidades de estos agentes de control biológico y extender la vida de anaquel de los productos con NEP. Treonis, Wall, and Virginia (2000) y Freckman and Demeure (1981) coinciden en que los juveniles bajo anhidrobiosis pierden entre el 95 y el 99% de su contenido de agua. Patel, Perry, and Wright (1997) han evaluado el secado lento y rápido de *S. carpocapsae* y *S. glaseri* en portaobjetos de vidrio y en solución acuosa con 1% (W/V) de agarosa y baja humedad relativa de 0, 20, 40, 60 y 80%. Sus resultados muestran que el cuerpo de ambos NEP consiste en 70-73% de agua, lo cual es consistente con lo reportado por Demeure and Freckman (1981) y *S. carpocapsae*

se indujo a anhidrobiosis a tasas menores que *S. glaseri*,  $0.78\% \text{ min}^{-1}$  y  $3.5\% \text{ min}^{-1}$ , respectivamente.

Crowe and Madin (1975) llevaron a cabo el secado de nematodos *Aphelenchus avenida* (agregados > 90 mg de peso húmedo) con una humedad relativa del 97% (HR) para inducir un estado anhidrobiótico y encontraron que cuando la tasa de pérdida de peso fue superior al 3% por hora, la supervivencia fue baja. Estudios como el de Kung et al. (1991) muestran que la supervivencia y la patogenicidad de *S. glaseri* aumentaron cuando el contenido de humedad del suelo (suelo franco arenoso: 58% de arena, 28% de limo, 14% de arcilla) fue 4% y disminuyeron con un contenido de humedad del suelo de 16 %. Un análisis de los datos de pérdida de peso de la formulación granular con *S. carpocapsae* reportados por Grewal (2000) muestra que la tasa de pérdida del contenido de humedad de  $0.0714\% \text{ día}^{-1}$ .

Estos resultados revelan la importancia de conseguir una baja tasa de pérdida de agua de la formulación granular para extender el tiempo de supervivencia de los JI. Sin embargo, no existe ninguna investigación que informe la forma en que las formulaciones de arcillas higroscópicas conteniendo *S. glaseri* pierden la humedad. Desde el punto de vista de los fenómenos de transferencia de masa y energía, Callahan et al. (1982) señala que el cambio en el contenido de humedad de los materiales desecantes en forma de polvos expuestos al ambiente depende de su contenido de humedad inicial y de la humedad relativa (HR) del medio circundante.

Puesto que la supervivencia del nematodo *S. glaseri* en reservorios granulares se mejora a través del control de la humedad de la estructura del gránulo, comprender como sucede la migración de agua en la formulación y predecir las condiciones bajo las cuales se logra la desecación gradual del NEP son de importancia para diseñar formulaciones adecuadas para el almacenamiento de nematodos de alta calidad, la extensión del tiempo de anaquel y el porcentaje de efectividad sobre el insecto plaga (Georgis, 2002; Hernandez-Zamora, González, Salazar, & Sánchez, 2009; San Blas, 2013; Matadamas-Ortiz et al. 2014). También es esencial disponer de información sobre la tolerancia a la desecación de las especies de NEP a ser encapsulados, la tasa de transferencia de humedad de los gránulos de arcillas higroscópicas y los adyuvantes para reducir la pérdida de humedad de la formulación.

Matadamas-Ortiz et al. (2014) encapsuló mecánicamente JI de la especie *S. glaseri* en pellets de arcillas higroscópicas por medio de flujo vertical descendente de polvos en tolvas convergentes y evaluó la supervivencia del nematodo. Su estrategia experimental para controlar la pérdida de

humedad del pellet fue aplicar agentes naturales gelificantes a la fase líquida del pellet, recubrir superficialmente al pellet, almacenar los pellets en frascos abiertos, semi abiertos y cerrados y usar material biológico de 2 edades. Reportó un incremento de 6.3 a 14.1 días de supervivencia y supervivencia promedio de 56% de nematodos de 3 días de edad en pellets de tierra diatomea (Celite® 209) almacenados en frascos cerrados a  $26\pm 6$  °C y 50-85% HR. Se concluyó que el tiempo de supervivencia aumentó porque se redujo la pérdida de humedad del pellet.

Otra contribución de su investigación es la mecanización del proceso de producción de pellets. Sin embargo, sus resultados muestran que a temperatura ambiente el tiempo de supervivencia de *S. glaseri* es bajo, lo que afecta la eficacia de la formulación frente a los plaguicidas químicos, limita la aceptación y comercialización de un producto biológico y frena la expansión del mercado de bioplaguicidas con NEP (Grewal & Peters, 2005; Lacey & Georgis, 2012). Porque se requiere incrementar el tiempo de supervivencia para extender la vida útil del producto al menos a 18 meses, como un requisito fundamental para la industrialización (Táborsky, 1992).

Shapiro and Glazer (1996), Koppenhöfer et al. (1997), Shapiro and Lewis (1999), Lewis, Shapiro-Ilan, and McCoy (2002) y Perez, Lewis, and Shapiro-Ilan (2003) explican que la suspensión de JI en agua después de la emergencia del cadáver del insecto hospedero puede causar estrés y afectar sus aptitudes. Sugieren que los JI que emergen directamente de los cadáveres al suelo tienen mayor tasa de supervivencia, de dispersión y de infectividad que los JI aplicados en suspensión acuosa. Entonces, otra posibilidad para mejorar el tiempo de supervivencia durante el almacenamiento y el transporte podría ser el uso de JI colectados directamente de los cadáveres de insectos usados para su reproducción. Sin embargo, tampoco hay información sobre la supervivencia e infectividad de los NEP mecánicamente pelletizados utilizando otros métodos de captura que no sean en trampa White.

En este trabajo, se estudia la formulación de los nematodos entomopatógenos *S. glaseri* en pellets de tierra diatomea para su uso como agentes de control biológico de *Phyllophaga vetula*, una plaga de los cultivos de maíz en los valles centrales de Oaxaca. En particular, se analiza la pérdida de humedad del pellet a través de métodos de modelación matemática, se prueban algunos factores biológicos en los JI para aumentar el tiempo de supervivencia y la infectividad contra el insecto plaga antes de la pelletización mecánica en TD y se sigue el método de diseño de Haik et al. (2010) para el diseño de una formulación para *S. glaseri* con desempeño mejorado.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La anhidrobiosis es un estado de reducción metabólica debido al sometimiento de los NEP a un proceso de desecación gradual que reduce su movilidad y suspende sus funciones vitales hasta un estado de quiescencia que reduce el consumo de lípidos y oxígeno en los NEP y preserva sus capacidades como agentes de control biológico (Grewal & Georgis, 1999), la anhidrobiosis se revierte cuando las condiciones de humedad vuelven a ser favorables.

El granulo es una formulación para el almacenamiento y transporte que aprovecha el principio de anhidrobiosis para el almacenamiento de NEP a largo plazo, después se disuelve en agua para su aplicación en medio acuoso por medio de sistemas de aspersion. Los gránulos han sido elaborados usando como material portador distintos materiales arcillosos y adyuvantes (Capinera & Hibbard; 1987; Connick et al.1993; Silver et al. 1995; Grewal, 2000a; Grewal, 2000b; Grewal & Georgis, 1998). Con esta formulación se ha logrado extender el tiempo de supervivencia de *S. carpocapse* entre 5 y 6 meses a temperatura de 25°C pero no se ha superado el 50% de viabilidad (Shapiro-Ilan et al. 2006; Shapiro-Ilan et al. 2012).

Atendiendo al principio de anhidrobiosis, las estrategias para el control de la pérdida de humedad del gránulo son: 1) controlar la humedad relativa del medio circundante durante el almacenamiento (Nicholls-Estrada, 2008), 2) combinar distintos materiales arcillosos para conseguir estructuras porosas con mayor retención de agua y 3) aplicar diferentes aditivos de recubrimiento de la superficie (Silver et al. 1995; Girón, 2008; Mendoza-Pérez, 2012; Matadamas-Ortiz et al. 2014).

El pellet es una formulación granular consistente en partículas discretas generalmente mayores de 10 mm<sup>3</sup> elaborada con arcillas higroscópicas y diseñada para el almacenamiento, transporte y aplicación sobre el suelo húmedo (Matadamas-Ortiz, et al. 2014). Mendoza-Pérez (2012) evaluó la supervivencia de *S. glaseri* pelletizado mecánicamente y comprobó que el encapsulamiento mecánico incrementa el tiempo de supervivencia y la dureza del pellet no tiene efecto significativo en la supervivencia de los JI. Después, Cruz-Martínez (2013) consiguió aumentar el tiempo de supervivencia de esta especie hasta 2 meses usando TD como material portador y controlando la humedad relativa en el almacenamiento.

No obstante, el bajo tiempo de supervivencia del nematodo en los pellets, la amplia variabilidad en la tasa de supervivencia y el desconocimiento de la efectividad de la formulación contra *P. vetula* limitan la vida de anaquel de esta formulación *con S. glaseri* son obstáculos para considerar a esta

una formulación práctica para su uso en el control de este insecto-plaga en cultivos de maíz u otros de importancia agrícola. La causa principal del limitado tiempo de supervivencia se le atribuye a la rápida pérdida de humedad del pellet bajo condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente y las estrategias empleadas para reducir la pérdida de humedad no han logrado resolver el problema.

Por lo anterior, es preciso conocer la influencia de las propiedades físico-mecánicas en las fuerzas intermoleculares que mantienen la cohesión entre los materiales, sus propiedades de flujo de humedad y los efectos sobre las funciones vitales de los NEP para producir pellets estables que extiendan la vida de anaquel de la formulación. También se requiere el análisis del transporte de humedad de las arcillas higroscópicas por medio de la simulación de estos fenómenos mediante modelos dinámicos que integren los sistemas mecánico microestructural e hidrodinámico del reservorio y fisiológico del NEP.

Estos conocimientos y herramientas son requeridas para producir pellets más adecuados para inducir a los NEP a un estado de anhidrobiosis a partir de los requerimientos de diseño (tasas de desecación, organización de la estructura, grado de desagregación, resistencia mecánica, entre otros), como un factor clave para mejorar la preservación de las capacidades de los NEP como agentes de control biológico (Matadamas-Ortiz et al. 2014). Además, estudios previos a la cepa de *S. glaseri* para determinar los requerimientos de humedad y conseguir la reducción de su metabolismo en los pellets son requeridos, porque para cada especie tales requerimientos son distintos (Matadamas-Ortiz et al. 2014). También seleccionar los materiales adecuados porque los fenómenos de masa y calor que se dan al interior y exterior del pellet, movilidad, procesos fisiológicos y la supervivencia de los JI deben ser considerados para diseñar el ordenamiento de la microestructura del reservorio (Hazir et al. 2003).

## JUSTIFICACIÓN

El uso indiscriminado y desmedido de plaguicidas químicos no es sustentable para la agricultura moderna, porque impactan negativamente en el medio ambiente y la salud. Por eso es importante aprovechar otras alternativas, como los agentes entomopatógenos que existen en la naturaleza para el desarrollo de productos biológicos para el combate de insectos plaga de importancia agrícola.

Los NEP de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae son agentes eficaces para el control biológico debido a su facilidad de adaptación, su alta letalidad contra las plagas principales (Shapiro-Ilan et al. 2002) e inocuidad (Grewal, 2002), están exentos de registro por la EPA en E. U. A. y son factibles de selección genética (Kaya & Gaugler 1993). En México, están aprobados para su uso en la agricultura orgánica y son compatibles con diversos plaguicidas.

Por lo cual, actualmente se persigue el desarrollo de tecnología para el almacenamiento, transporte y aplicación de NEP como agentes de control biológico de plagas del suelo que además sean capaces de: 1) proteger a los nematodos de los factores abióticos, 2) conservar las capacidades de este organismo por tiempo suficiente hasta hacer llegar un producto viable al consumidor y 3) que sean de igual o superior eficacia que el control químico como un requisito para aceptación por el consumidor final.

Desde el punto de vista de la ingeniería, el pellet es un objeto de diseño que consiste de una matriz granular formada con partículas sub-microscópicas estructuralmente unidas entre sí por ligantes líquidos (p, ej. agua) y agentes gelificantes (coloides, geles, etc.), además del efecto de la agregación mecánica (rodadura, compresión, fricción, etc.), cuya combinación genera una estructura física a través de la cual se realizan procesos de intercambio de masa y energía entre la matriz y su medio circundante. En la formulación de pellets con NEP interviene al menos 3 disciplinas del conocimiento para su diseño: biología, agronomía e ingeniería. Además, para la elaboración industrial de pellets se requiere de un proceso de producción masivo a costos competitivos, de calidad estable, y con bajo impacto ecológico.

Teóricamente, cuando las condiciones adecuadas de humedad y de oxígeno en el pellet son adecuadas, se puede aumentar la viabilidad y preservar el estado infectivo de los NEP por largo tiempo para almacenar, transportar y aplicar los NEP y entonces se convierte en un medio de conservación porque controla la actividad metabólica para mantener las funciones vitales de los NEP; estas condiciones a su vez, determinarán sus aptitudes como agentes de control biológico

después de su reactivación, emergencia, búsqueda, penetración e infección del insecto-plaga. Entonces, se transforma en un reservorio de supervivencia con mejoras en la termoestabilidad, manejabilidad y facilidad de aplicación del NEP y en combinación con un ambiente de aplicación favorable se controla efectivamente una plaga (Figura 1).

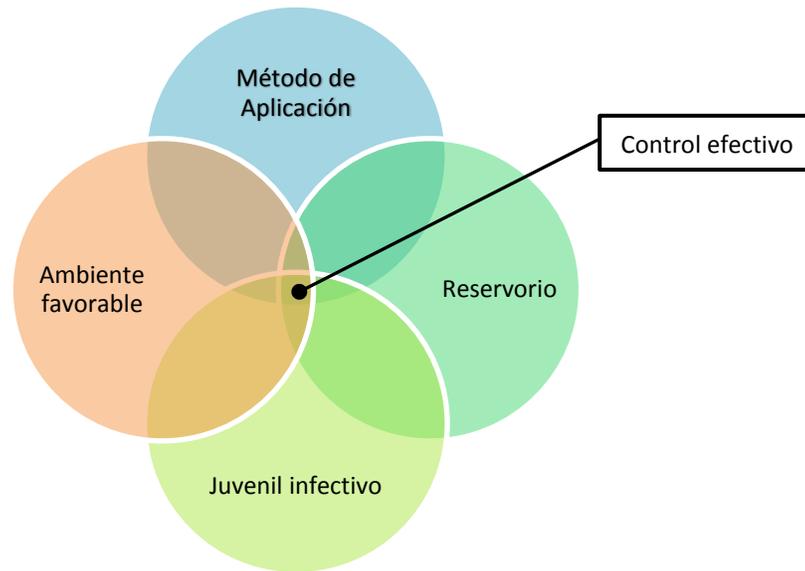


Figura 1. Esferas de influencia que representan las consideraciones para el control efectivo de poblaciones de insectos plaga con nematodos entomopatógenos.

En el pellet, estos fenómenos están interrelacionados de manera compleja. En este estudio se busca conocimiento básico para comprender el funcionamiento del metabolismo del NEP en función del proceso de desecación del pellet para hacer lo necesario para incrementar la viabilidad de los nematodos *S. glaseri*, así como su efectividad como agentes de control biológico de insectos plagas que habitan en el suelo.

El presente estudio forma parte de una investigación más extensa que se ocupa del desarrollo de tecnologías para la producción mecánica de bioplaguicidas para almacenar, transportar y aplicar NEP directamente en el suelo, como agentes de control biológico de la plaga de la gallina ciega *P. vetula* en cultivos de maíz de las zonas de riego de temporal en el Estado de Oaxaca.

Esta propuesta de investigación básica es pertinente para el Plan Nacional de Desarrollo, en su Eje 4, Objetivo 4.10., donde se busca tener independencia tecnológica en biotecnología aplicada en el sector agropecuario, detener la contaminación ambiental provocada por el uso desmedido de plaguicidas agrícolas y mejorar la productividad sustentable del sector agrícola.

## **OBJETIVO GENERAL**

Diseñar reservorios microestructurados de TD (pellets) para contener nematodos entomopatógenos *Steinernema glaseri* con viabilidad y patogenicidad mejoradas para el control larvas de *Phyllophaga vetula*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analizar la pérdida de la humedad de los pellets de TD por desecación a temperatura ambiente mediante modelos matemáticos de transporte de humedad en sólidos porosos.
- Evaluar la pérdida de humedad del pellet de TD y sus efectos en la supervivencia del nematodo *S. glaseri* e infectividad contra *G. mellonella*.
- Evaluar el envejecimiento de los juveniles infectivos de *S. glaseri* y su efecto en la infectividad contra *P. vetula*.
- Evaluar la preaclimatación de los juveniles infectivos antes de la pelletización en TD y su efecto en el tiempo de supervivencia e infectividad contra *P. vetula*.
- Determinar las especificaciones de ingeniería para el diseño de un reservorio microestructurado para nematodos *S. glaseri*.

## **CAPÍTULO 1 Generalidades**

### **1.1. Nematodos Entomopatógenos**

Estos microorganismos son parásitos obligados de insectos y reguladores naturales de las poblaciones. También se aplican como agentes de control biológico para suprimir las poblaciones de insectos plaga edafícolas y foliares. Los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* son los más importantes.

En México, la investigación para la aplicación de NEP en cultivos de importancia agrícola se inició hace 30 años, motivada por ofrecer alternativas a los agricultores para detener el uso desmedido de plaguicidas químicos, los daños a la salud y la contaminación ambiental, y actualmente para mejorar la productividad sustentable del sector agrícola y lograr la independencia biotecnológica requerida en el sector agropecuario (Plan Nacional de Desarrollo, Eje 4, Objetivo 4.10).

Actualmente, la investigación en este campo crece gradualmente abarcando las áreas de identificación de especies nativas y ecología, reproducción masiva y la formulación. Sobre este último, se estudian las relaciones importantes para el mejoramiento de la tolerancia a los factores bióticos y abióticos que influyen en la vida útil de los NEP en la formulación y cuando son aplicados en cultivos de importancia agrícola.

### **1.2. Nematodos juveniles infectivos**

Los nematodos juveniles infectivos (JI) o dauers son la única etapa de vida libre, típicamente ocupan hábitats del suelo hasta que logran infectar un insecto, lo que tienen que hacer para reanudar su desarrollo y reproducirse (Shapiro-Ilan et al. 2012). El suelo es el reservorio natural de los NEP y en las situaciones de humedad reducida del suelo los JI pueden sobrevivir porque reducen su metabolismo y entran en un estado de reducción metabólica reversible inducido llamado anhidrobiosis en el que pueden vivir hasta 3 años (Antoniou, 1989; Silver et al. 1995; Grewal & Georgis, 1999; Alpert, 2005; Huang et al. 2010).

Probablemente, *S. glaseri* es el agente de control biológico con más potencial para el combate de la gallina ciega *Phyllophaga* spp. (Coleoptera: Scarabeidae), principal plaga edafícola en el cultivo de maíz debido a las pérdidas que producen en la calidad y rendimiento (Jackson and Klein, 2006). En ensayos de laboratorio, esta especie fue la de mayor efectividad contra *P. vetula* Horn (Girón-Pablo et al. 2015).

### **1.3. Formulación de NEP**

Es el proceso de proporcionarles apoyos para conservarlos viables por el mayor tiempo posible y facilitar su aplicación para aumentar su eficacia en campo (Burges, 1998). Las funciones importantes de la formulación son: mejorar su estabilidad de almacenamiento durante la distribución y almacenamiento, facilitar el manejo y la aplicación del producto con NEP, proteger a los NEP de las condiciones ambientales adversas y potenciar su actividad mediante el aumento del contacto e interacción con la plaga (Ravensberg, 2011).

Generalmente, los componentes de las formulaciones desarrolladas son: un ingrediente activo y un vehículo, que puede estar constituido por un material de base y adyuvantes. Los ingredientes activos en las formulaciones son los NEP, mientras que los portadores utilizados son materiales sólidos, líquidos, geles o incluso el cadáver del hospedero. Los adyuvantes son diversas sustancias con funciones diferentes, tales como absorbentes, adsorbentes, emulsionantes, tensioactivos, espesantes, antioxidantes, humectantes, dispersantes, agentes antimicrobianos y protectores de rayos UV, entre otros (Grewal 2002; Sharma et al. 2011). Los adyuvantes se han utilizado principalmente para aumentar la supervivencia y mantener la virulencia del NEP, pero en algunos casos pueden tener efectos negativos; el formaldehído puede causar cáncer (Coggon et al. 2003) y el uso de citrato de sodio para disolver la capsula de alginato puede convertir la solución salina del suelo, lo que afecta su equilibrio hídrico.

Los productos comerciales para el almacenamiento y el transporte de NEP se distribuyen en Europa y Norteamérica (Kaya et al. 2006), pero la mayoría de ellas requieren refrigeración, equipo de pulverización para la aplicación o tienen bajos porcentajes de efectividad. Por lo tanto, mayor investigación y diseño de tecnologías son requeridos para producir formulaciones para almacenamiento a temperatura ambiente con alto tiempo supervivencia, aplicación directa al suelo y alta efectividad contra el insecto plaga (Grewal, 2000).

La investigación teórica y práctica para la producción y elaboración de bioplaguicidas a base de NEP tiene una historia que inicio en Norteamérica en 1980, viendo nacer a empresas como Biosys® con el granulo dispersable en agua como su principal producto para el combate de gusano blanco en campos de Golf y jardines (Georgis & Kaya, 1998). Las principales formulaciones que se han desarrollado para los NEP son: suspensión acuosa, esponja, gránulos dispersables en agua, geles y cadáver (Táborský, 1992; Seaman, 1990; Mollet, 2001).

La formulación en vermiculita mejoró significativamente el tiempo de supervivencia de 2 meses a 22-25 °C de *S. carpocapsae* y se puede aplicar por varios sistemas de pulverización comerciales (Grewal, 2002). Anteriormente, Bedding (1998) desarrolló una formulación de arcilla atapulgita en la que encapsuló *S. feltiae*, *S. bibionis*, *S. glaseri* y *H. heliothidis* y sobrevivieron hasta 8 semanas a 23 °C. La formulación se llamó tipo "sandwich", debido a que los nematodos se mantuvieron almacenados entre dos capas de arcilla. Los productos con esta formulación se vendieron por Biotechnology Australia Ltd, pero se suspendió su comercialización debido a la pobre estabilidad de almacenamiento, la obstrucción de las boquillas de aspersion y la baja proporción nematodo-arcilla (Grewal 2002).

Capinera and Hibbard (1987) elaboraron pellets con harina de alfalfa y *S. feltiae* para el control de *Melanoplus spp.* y consiguieron una efectividad de 78%. Connick, et al. (1993) desarrollaron gránulos de harina de trigo llamado "Pesta" con *S. carpocapsae* pero la tasa de supervivencia de los juveniles a 21 °C después de 6 semanas fue baja. En este trabajo, se observó que la harina de trigo y la alta HR promovieron el crecimiento de hongos y bacterias. En vista de esto, Connick et al. (1994) añadieron 0.2% de formaldehído a la mezcla de harina de trigo, bentonita, caolín y turba y almacenaron *S. carpocapsae* durante 26 semanas a 21 °C, lo que causó 100% de mortalidad de la polilla de la cera (*G. mellonella*). Estos gránulos también fueron evaluados por Níckel et al. (1994) en invernadero para controlar el gusano de la raíz del maíz y larvas de escarabajo de la papa, logrando un control de 90% de los insectos.

Silver et al. (1995) produjeron gránulos combinando la tierra de diatomeas, hidroxietilcelulosa, sílice amorfa, sílice de pirólisis hidrófoba, lignosulfonato, almidón, almidón pregelatinizado, y arcilla de atapulgita pregelificado, y las especies de nematodos *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. scapterisci* y *S. riobravis* y reporta supervivencia del 90% de los JI durante 6 semanas a 25°C. Georgis et al. (1995) describen una formulación similar con *S. carpocapsae* como gránulos dispersables en agua, el tiempo de supervivencia fue de 6 meses almacenados de 4 a 25 °C.

La supervivencia de *S. carpocapsae* se logró aumentar con los gránulos dispersables en agua desarrollados por Grewal (2000a) con una tasa de supervivencia mayor que 80% y la infectividad mayor que 60% después de 5 meses de almacenamiento a 25°C. Grewal (2000b) almaceno *S. carpocapsae*, *S. feltiae* y *S. riobravis* durante 5 meses a 25°C y consiguio un 90% de supervivencia. Después, Grewal (2002) encapsuló nematodos *S. carpocapsae* en una combinación de los materiales recomendados por Silver et al. (1995) y registro disminución en el consumo de oxígeno

y gasto de lípidos, y alcanzó 7 meses de supervivencia a 25 °C, lo que muestra que la inducción de la anhidrobiosis en formulaciones granulares aumenta la longevidad de los IJ de *S. carpocapsae*, porque la formulación en materiales arcillosos absorbe la gota de suspensión que contiene al nematodo y comienza un proceso de secado similar al que ocurre en el suelo (Hernández et al. 2009; San-Blas, 2013). Esta formulación se elabora mediante la variación de los tipos y proporciones de materiales portadores y aditivos, lo que hace que su diseño sea complejo. El almacenamiento de NEP en sustratos también se ha utilizado; un sustrato de espuma fue probado por Andaló et al. (2010), logrando tasas de supervivencia de 57.5% y del 55.6% después de 180 días para *S. carpocapsae* y *Heterorhabditis spp.*, respectivamente.

En los últimos 35 años, la generación de conocimiento científico y desarrollo de tecnología para producir bioplaguicidas a base de NEP han ido en aumento, sin embargo, el almacenamiento de las formulaciones a temperatura y humedad relativa ambientales afecta negativamente el tiempo de supervivencia de los NEP encapsulados en formulaciones granulares, lo que disminuye su eficiencia, limita su aceptación, dificulta la comercialización y afecta la expansión del mercado de bioplaguicidas con NEP frente a los plaguicidas químicos (Grewal & Peters, 2005; Lacey & Georgis, 2012; Matadamas-Ortiz et al. 2014).

#### **1.4. Transporte de humedad en las formulaciones granulares**

El contenido de humedad y TPH son parámetros de control de calidad para mejorar la estabilidad en almacenamiento de las formulaciones comerciales bajo condiciones de temperatura y HR ambientales y para mantener JI viables y patógenos para su uso en el combate de insectos plaga (Grewal & Peters, 2005; Perry et al. 2012). Silver et al. (1995) afirman que el aumento de la supervivencia y el mantenimiento de la infectividad de los JI contenidos en gránulos se consiguen mediante la inducción a un estado parcial de anhidrobiosis y el proceso de desecación que lo induce se controla mediante la selección apropiada de los materiales de arcilla, aditivos añadidos a la suspensión y el método de elaboración de la formulación granular.

Los JI de la especie *S. glaseri* fueron pelletizados mecánicamente y se investigó la aplicación de adyuvantes para reducir la pérdida de humedad de la formulación y su efecto en el tiempo de supervivencia (Matadamas-Ortiz et al. 2014). La estrategia experimental consistió en hacer mezclas de TD y arcilla atapulgita para modificar la porosidad del pellet, aplicar mucilago de nopal o grenetina a la suspensión acuosa con JI, usar JI de 2 edades (2 días y 3 meses), recubrir

superficialmente al pellet con aceite de girasol y almacenar los pellets a temperatura ambiente ( $23 \pm 6^\circ\text{C}$  y 50-85% HR) en frascos abiertos, semiabiertos y cerrados. La combinación más promisoría, en términos de capacidad de supervivencia, fue pelletizar juveniles de 3 días de edad en TD depositados en frascos cerrados. El tiempo medio de supervivencia incrementó de 14.1 días respecto al control y el porcentaje de JI sobrevivientes fue de 56%. Utilizando TD, el mismo método de pelletización y almacenamiento de los pellets a  $24 \pm 6^\circ\text{C}$  y  $95 \pm 2\%$  HR el tiempo medio de supervivencia aumento a 40 días (Cruz-Martínez, 2013).

A través de un análisis de los resultados presentados se encontró que la tasa de pérdida de contenido de humedad (TPCH) promedio del pellet preparado por Cruz-Martínez (2013) fue  $0.170 \mu\text{Lh}^{-1}$ , mientras que la TPCH promedio del gránulo preparado por Grewal (2000) fue de  $0.0714\%$  día<sup>-1</sup>. Así que se puede ver que la lenta pérdida de humedad del pellet mejora la supervivencia de los JI, en comparación con pellets que pierden el agua con rapidez. Mejoras en la supervivencia de *S. glaseri* también se ha observado en procesos experimentales de secado lento en agarosa contra el secado rápido en placas de Petri (Patel et al. 1997a).

Los materiales higroscópicos sólidos son de estructura porosa y la pérdida de humedad ocurre bajo dos modos distintos de transporte: molecular y convectivo por evaporación en la superficie. El transporte molecular en medios porosos sucede de dos maneras distintas, por difusión desde una región de alta concentración hasta otra de baja concentración de la sustancia y por medio de conductos (capilaridad) (Zhang and Datta, 2004).

Fenómenos como la difusión, adsorción y reactividad de moléculas dentro de los materiales micro o meso porosos están específicamente relacionadas con las propiedades físico-químicas de sus estructuras y las interacciones de las moléculas de agua con superficies de los materiales dependen del tamaño, forma y topología de las cavidades, que generan las organizaciones particulares de estas moléculas y su movimiento (Dérrouane et al. 1988). A estas interacciones se les atribuye un papel importante en el mejoramiento de la viabilidad y la patogenicidad de los NEP encapsulados mecánicamente en arcillas y almacenados bajo condiciones de temperatura y humedad relativa ambientales (Matadamas-Ortiz et al. 2014).

### **1.5. Mortalidad de los NEP en pellets de TD**

Pese a los avances conseguidos en el desarrollo de nuevas formulaciones con estabilidad de almacenamiento mejorada, la rápida desecación de los pellets de arcillas es la causa principal del

bajo tiempo de supervivencia del nematodo *S. glaseri* encapsulado mecánicamente y almacenados bajo condiciones de temperatura y HR ambientales (Matadamas-Ortiz et al. 2014).

Hipotéticamente, la humedad inicial del pellet se transporta a través de su estructura hacia su capa externa por gradientes concentración de humedad, mientras, de manera simultánea el material del pellet remueve la humedad contenida en el cuerpo del NEP por desorción a través de su cutícula permeable, lo transporta por difusión y después se transfiere por evaporación desde la superficie hacia el aire circundante. El proceso de desecación del pellet se detiene cuando este alcanza el contenido de humedad de equilibrio, el cual en pellets sin recubrimiento depende completamente de la humedad relativa del aire circundante. La rápida desecación del nematodo se explica porque la contracción de las células causado por la pérdida inicial de agua de su cuerpo reduce el contacto entre las membranas celulares y paredes celulares de la cutícula, lo que aumenta su permeabilidad y la tasa de pérdida de agua, sobre todo en los espacios intercelulares (Freckman, Kaplan, & Van Gundy, 1977; Rastogi et al. 2005).

La acelerada pérdida de agua del pellet es crítica para los nematodos, puesto que en el suelo, que es su hábitat natural, su supervivencia está asociada a la rapidez del proceso de desecación del suelo, y en *S. glaseri*, los cambios bioquímicos y moleculares necesarios para estabilizar la cutícula y reemplazar el agua pérdida por la trehalosa en un estado parcial de anhidrobiosis son inducidos bajo procesos de secado a muy baja tasa de pérdida de agua (Patel et al. 1997a,b; Patel & Wright, 1998; Wharton, 2002). Entonces, un proceso de desecación acelerado como el que sucede en el pellet tiene un efecto negativo en la viabilidad y patogenicidad de *S. glaseri*.

## **1.6. Estrategia convencional para formular NEP en gránulos o pellets**

Silver et al. (1995) describe las características de una formulación granular, el proceso que causa la inducción de la anhidrobiosis, la selección de los ingredientes y el almacenamiento de la formulación. En este apartado se reproduce tal información por ser la descripción más general y aceptada que se puede encontrar en la literatura.

“Las formulaciones granulares consisten de un núcleo central, compuesto de nematodos básicamente puros, rodeados y encerrados completamente por una capa de materiales en polvo humedecidos que han sido agregados por las técnicas asociadas a la formación de los gránulos para formar un revestimiento protector continuo alrededor del núcleo central de nematodos. Los

nematodos del centro pueden estar o no parcialmente desecados, controlándose el grado de desecación por la selección de los materiales y los métodos de producción

Los gránulos recién preparados tendrán típicamente niveles de humedad de aproximadamente 35-55 %, más preferiblemente alrededor de 40-45%, incluyendo la humedad de los nematodos propiamente dichos. La “actividad de agua”, que es una medida del agua reactiva libre de los gránulos recién preparados se encuentra típicamente en el intervalo de 0.930 a 0.995 y preferiblemente en el intervalo de 0.96 a 0.98 para formulaciones que contienen el nematodo *S. carpocapsae*. Tanto las propiedades de nivel de humedad como la actividad de agua pueden verse influenciadas por la absorbancia del polvo o polvos utilizados en la formulación seca seleccionados, por el contenido de agua de la suspensión acuosa de nematodos utilizada y por la cantidad de pérdida de agua que ocurre durante la fabricación. En los gránulos descritos, la pérdida de humedad puede ocurrir muy gradualmente de modo que los nematodos pueden adaptarse durante largo tiempo a la supervivencia en un estado parcialmente desecado.

Por selección de los polvos utilizados, o por control subsiguiente del contenido de humedad, los nematodos pueden someterse, si se desea, a una desecación parcial, reduciendo con ello su actividad metabólica y aumentando su supervivencia durante el almacenamiento. La capa circundante regula también los cambios en el nivel de humedad del producto sirviendo como un depósito o desagüe dinámico para el exceso de humedad. Los gránulos pueden modificarse por un procedimiento de revestimiento secundario en el que se añade un líquido o una capa de polvo a la capa de encerramiento inicial. Esta capa adicional puede utilizarse para mejorar la resistencia mecánica, modificar las propiedades de disolución, modificar las propiedades de pérdida de agua, proteger frente a la contaminación microbiana, entre otros.

La suspensión acuosa de NEP puede contener además otros materiales solubles o insolubles, tales como cargas y agentes de aumento de la viscosidad, que contribuyen a las propiedades físicas de los gránulos. Pueden usarse modificadores de la viscosidad, tales como Nalcotrol® (Nalco Corporation), poli (ácidos acrílicos), gomas biológicas tales como goma Xanthan. La suspensión acuosa puede contener también uno o más humectantes. Los materiales humectantes pueden incluir, aunque sin estar limitados a ellos, glicerol, azúcares tal como sacarosa, emulsiones invertidas y éteres de celulosa.

La solución acuosa en la que están en suspensión los nematodos, y que está encerrada en el gránulo, puede contener además uno o más componentes adicionales que protegen los nematodos de la

contaminación no deseada. Por ejemplo, puede añadirse un antibiótico bactericida o fungicida para evitar la infección, siempre que este antibiótico no sea tóxico para los nematodos. En casos en los que la contaminación bacteriana o fúngica de los productos pueda ser un problema, los ingredientes de la formulación pueden esterilizarse antes de la adición de los nematodos o la producción de los gránulos, siempre que cualquiera de los procedimientos de esterilización utilizados no afecten adversamente a las propiedades de formación de los gránulos del polvo o la eficacia del producto final.

Los “pellets” pueden envasarse de cualquier modo compatible con la supervivencia y el mantenimiento prolongados de la viabilidad de los nematodos. Así, por ejemplo, los gránulos se colocan en frascos, preferiblemente de polipropileno, que tengan volúmenes en el intervalo de aproximadamente 50 ml a aproximadamente 4 litros. La tapa del frasco se diseña para que permita una oxigenación adecuada de los nematodos encerrados. Así, la tapa tiene preferiblemente una cápsula de plástico porosa que permite el intercambio de gases entre el medioambiente y el frasco. Debido a que se desea mantener un cierto nivel de actividad de agua y evitar la pérdida de agua, el envasado puede incluir medios para mantener la humedad en el intervalo deseado, tal como un depósito de humedad o un material absorbente que contenga agua (Silver et al. 1995).

### **1.7. Ingeniería de pellets con NEP, una estrategia alternativa para el desarrollo de bioplaguicidas granulares**

La mayor parte de los estudios realizados en las dos últimas décadas se centraron en evaluar la eficacia del formulado, la efectividad de los NEP y en proponer alternativas para solucionar la baja tolerancia de transporte y la pobre duración del tiempo de almacenamiento de las formulaciones. También los materiales, los procesos y la tecnología de producción de formulaciones granulares fueron explorados para seleccionarse teniendo en cuenta su interacción con factores bióticos y abióticos para el mejoramiento de su desempeño en campo.

La investigación futura también debe centrarse en el estudio de las formulaciones a través de un enfoque sistemático para identificar materiales nuevos y seguros del excipiente, que, además de aumentar el tiempo de supervivencia y eficacia, optimicen la formulación para la aplicación directa en el suelo, así como a la estandarización del producto final.

Para lograr una mejor eficiencia en la aplicación de los NEP en el campo y para diseñar las formulaciones, es necesario mejorar los conocimientos sobre la fisiología del nematodo, su ecología

en el suelo, los métodos de cultivo y mejorar la comprensión del papel de los tensoactivos (también llamados surfactantes), dispersantes, emulsionantes, separadores, y otros adyuvantes, lo que resultara en nuevas y más seguras formulaciones (Ravensberg, 2011).

Es posible mejorar la formulación granular para que además de funcionar para el almacenamiento y el transporte de NEP, sirva para la aplicación directa en suelo húmedo. A partir de replantear su diseño como una microestructura que sirve de reservorio para el JI. De modo que los factores importantes a considerar en el diseño serían: a) las características del medio líquido, especialmente la viscosidad de la solución; b) las propiedades de los materiales granulares como: tamaño y distribución de tamaño de partícula, higroscopicidad, pH del material y la densidad; c) los procesos físicoquímicos presentes en el sedimento como: la transferencia de la humedad y el oxígeno y reacciones químicas; y d) la preparación de pellets y el almacenamiento relacionados con la compactación, la temperatura y la humedad relativa. Todos estos factores y su combinación pueden tener un efecto en la supervivencia y la patogenicidad de los NEP debido a los efectos físicos y químicos derivados de la interacción entre los componentes de la formulación.

Al respecto, es necesario estudiar los materiales para su elaboración teniendo en cuenta su interacción física, química y mecánica entre sí y con los NEP, cambiando las condiciones iniciales y de frontera con el fin de identificar los materiales y métodos que pueden inducir gradualmente a los juveniles a un estado parcial de anhidrobiosis. Otro aspecto de interés es la aplicación de la formulación bajo diferentes condiciones, lo cual requiere considerar los valores particulares de la variación de la humedad del suelo, la temperatura, el pH y la textura del suelo, la radiación ultravioleta y humedad relativa (Lacey & Georgis, 2012; Shapiro-Ilan et al. 2012; Miles, Blethen, Gaugler, Shapiro-Ilan, & Murray, 2012) para elegir los materiales activos e inertes que componen la formulación.

La meta será aumentar la calidad de las formulaciones para garantizar la virulencia del JI contra el insecto plaga y obtener una relación costo/beneficio que sea positiva. Por lo tanto, es necesaria una mejor utilización de los conocimientos y tecnologías de la ingeniería de los materiales y procesos de manufactura. Además, es necesario considerar otros factores como el contexto socio-económico-cultural y tecnológico que puedan oponerse o promover la adopción de productos con NEP para el control biológico de plagas en cultivos de importancia agrícola.

Desde una perspectiva de innovación, la investigación que se debe perseguir para el mejoramiento de los productos con NEP debe ser multidisciplinaria. En vista de lograr el desarrollo de

bioplaguicidas que puedan competir en desempeño con los plaguicidas químicos, lo cual tiene implicaciones en el mejoramiento de la tolerancia biológica a los factores bióticos y abióticos que influyen en la supervivencia y efectividad de los NEP, tanto en la formulación como después de su aplicación en el cultivo.

Para ello, se propone el estudio de los procesos biofísicos y bioquímicos involucrados en el desarrollo de las funciones vitales de los NEP con herramientas de análisis como la modelación matemática de los fenómenos de transporte de masa y calor para investigar las relaciones involucradas en estos procesos y establecer parámetros de diseño de la formulación para cada NEP susceptible de ser usado como agente de control biológico (Figura 2).

Este estudio es el primer paso para conseguirlo. En particular, la propuesta de esta investigación consta de dos partes principales. La primera comprende el desarrollo de un modelo de transferencia de humedad de arcillas higroscópicas (MTH-AH) para estudiar la pérdida de humedad de la formulación granular, la evaluación de la tolerancia a la desecación del nematodo *S. glaseri* pelletizado en pellets de TD y su infectividad contra *P. vetula*.

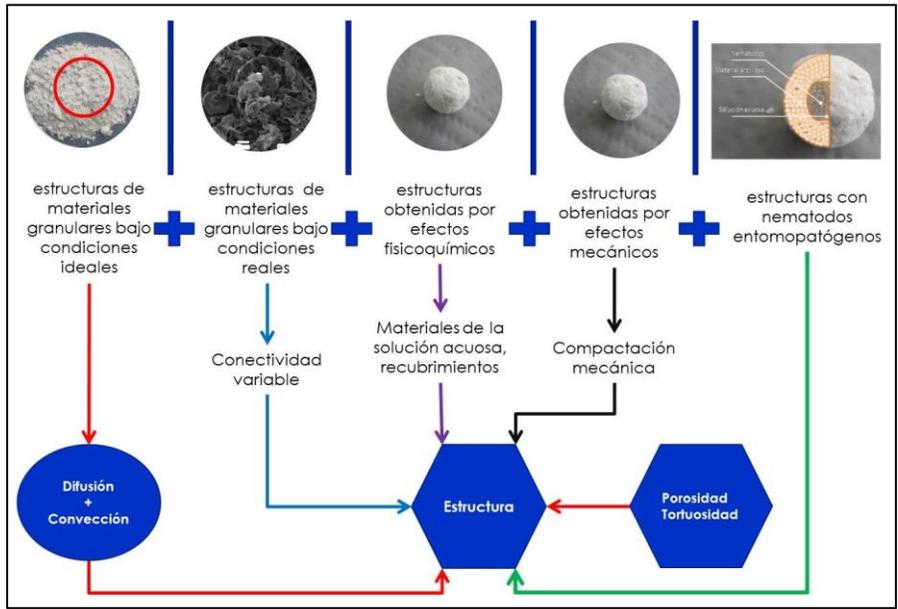


Figura 2. Propuesta de investigación para el desarrollo de la metodología de diseño de reservorios microestructurados para NEP.

## **CAPÍTULO 2 Materiales y Métodos**

### **2.1. *S. glaseri* (raza NJ-43)**

Los nematodos fueron proporcionados por el Departamento de Entomología de la Universidad de California, Davis, USA, al laboratorio de Control Biológico del CIIDIR Oaxaca. Se han reproducido periódicamente a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  en larvas de último instar de la polilla de la cera *Galleria mellonella*, se depositan en agua bidestilada y se almacenan en una unidad de refrigeración a  $12^\circ\text{C}$ .

### **2.2. Larvas de *Phyllophaga vetula***

Larvas de tercer instar fueron colectadas en Cuilapam de Guerrero, Oaxaca, México. El periodo de colecta fue durante los meses de julio a diciembre de 2014. La presencia del insecto plaga en las estaciones de crecimiento anteriores fue uno de los criterios para la elección del sitio de muestreo, así como los síntomas visibles en el cultivo que indicaban la presencia de la plaga.

### **2.3. Material para la pelletización**

La TD (Celite<sup>®</sup> 209) es un material comercialmente suministrado por Imerys Minerals California, Inc., el cual consiste de partículas originalmente formadas a partir de las paredes celulares de las algas unicelulares, con simetría radial y simetría bilateral. En este material se observa una variedad de tamaños de partículas y formas incluyendo la presencia de varillas cilíndricas enteras, discos en forma de panal de abejas y fragmentos de varillas y discos. La TD se utiliza en la formulación de bioplaguicidas microbianos debido a su capacidad de absorción de humedad (Behle and Birthisel, 2014; Silver et al, 1995). Por el tamaño de partícula reportado se clasifica como polvo (Rouquerol, Rouquerol, & Sing, 1998). La TD fue previamente secada y esterilizada a  $105^\circ\text{C}$  por 24 horas. Las propiedades físicas y térmicas y la composición química del material se muestran en el Anexo 1.

### **2.4. Cladodios de nopal**

Los cladodios son brotes fotosintéticos y reservorios de agua de la planta *Opuntia ficus indica* (comúnmente conocida como nopal), su forma es aplanada como una raqueta (60 a 70 cm de longitud y espesor de 2 a 3 cm). Dentro de sus tejidos, hay células que almacenan mucílago. El mucílago exhibe la propiedad osmótica de retención de agua. En particular, el mucílago de *O. f. indica* se compone de arabinosa, galactosa, ramnosa, xilosa y ácido galacturónico. El mucilago funciona como agente gelificante natural cuya adición a las tabletas farmacéuticas mejora su

viscosidad y en pellets con NEP incrementa la viscosidad de la fase líquida para retener más humedad (Sepúlveda et al. 2007; Jani et al. 2009, Matadamas-Ortiz et al, 2014). Cladodios frescos fueron cosechados en el Jardín Botánico Regional “Cassiano Conzatti” del CIIDIR Oaxaca para obtener el extracto de nopal.

## **2.5. Propagación de *S. glaseri***

En el Laboratorio de Nematología de la Universidad de California, Davis, a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y en el laboratorio de Control Biológico del CIIDIR Oaxaca a  $23 \pm 3^\circ\text{C}$  fue realizado el cultivo en vivo de los nematodos *S. glaseri*. Como hospedero se utilizaron larvas de último instar de la polilla de la cera *G. mellonella* siguiendo el método propuesto por Kaya & Stock (1997) a una tasa de exposición de 100 JI por larva en cajas Petri con discos de papel filtro (diámetro de 90 mm; Whatman no. 1). Los cadáveres de los hospederos fueron revisados diariamente para inspeccionar la aparición de JI. Los JI fueron colectados y concentrados en agua bidestilada.

### **2.5.1. En trampa White modificada**

Tres días después de la inoculación, los hospederos infectados fueron colocados individualmente en trampas White invertida con discos de papel filtro (diámetro de 60 mm; Whatman no. 1). Los primeros JI que emergieron del hospedero fueron escasos pero luego de 24 h comenzaron a emerger masivamente. Por lo tanto, el momento en que sucedió este evento fue aceptado como el inicio de la emergencia de JI. Después, los JI fueron colectados de la trampa, concentrados en agua bidestilada y depositados en un frasco de cultivo de tejidos de 250 mL

### **2.5.2. En caja Petri con yeso de Paris**

El método de crianza en cajas Petri con yeso de Paris descrito por Stock and Goodrich-Blair (2014) fue llevado a cabo. Tres días después de la inoculación de *G. mellonella*, los hospederos infectados se colocaron en cajas Petri preparadas con una capa de yeso de Paris y fueron mantenidos a temperatura de  $23 \pm 3^\circ\text{C}$ . Gotas de agua bidestilada fueron aplicadas ocasionalmente sobre el yeso para prevenir la desecación de los hospederos. Los cadáveres fueron revisados diariamente para inspeccionar la aparición de JI. Tres días después del inicio de la emergencia masiva, los JI fueron enjuagados de la base de YP con agua bidestilada y depositados en un frasco de cultivo de tejidos de 250 ml.

## **2.6. Dosificación de *S. glaseri***

Los JI colectados y concentrados en agua bidestilada, fueron contados inmediatamente bajo el microscopio estereoscópico ( $\times 20$ ) y se utilizó la serie de dilución en serie para estimar la densidad de JI colectados. Después, el método de disoluciones volumétricas de Petersen and Willis (1972) fue usado para concentrar los NEP a una tasa de  $1000 \pm 50$  JI por cada 200  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada. Esta preparación fue nombrada suspensión acuosa de JI.

## **2.7. Aclimatación de *S. glaseri***

Dos condiciones de aclimatación fueron llevadas a cabo para preparar a los JI antes de la pelletización en TD. En el primero, llevado a cabo en el laboratorio de Nematología de la Universidad de California, Davis, la suspensión acuosa de JI se aclimató durante 24 horas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  en una incubadora antes de su uso (Chen & Glazer, 2005). En el segundo, realizado en el laboratorio de Control Biológico del CIIDIR Oaxaca, la suspensión acuosa con JI se aclimato en una incubadora a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  antes de ser utilizados.

## **2.8. Determinación del contenido de humedad de *S. glaseri***

El secado superficial de los NEP se realizó mediante la colocación de  $1000 \pm 50$  JI en discos de papel de nitrocelulosa (47 mm de diámetro y 0.45 m de tamaño de poro) para eliminar el exceso de agua superficial por succión de vacío (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, MA) (Liu & Glazer, 2000; Charwat et al. 2002). Después, los JI se sometieron a un protocolo de secado a  $105^\circ\text{C}$  durante 24 horas en un horno de secado (Crowe & Madin, 1975). El peso de los JI se registró por el método gravimétrico utilizando una balanza analítica (Bhowmick et al. 2003). El porcentaje de humedad de los JI es función de peso húmedo (antes del secado) y el peso en seco (después del secado) y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$CH_{JI} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (1)$$

Dónde  $CH_{JI}$  es el contenido de humedad en %,  $P_f$  es el peso seco en y  $P_i$  es el peso húmedo. La determinación se realizó 5 veces. Este experimento se llevó a cabo en el laboratorio de Nematología de la UC Davis.

## **2.9. Pelletización**

### **2.9.1. Mezclador de vórtice**

Este método es descrito por Silver et al. (1995). 10 g de TD se colocaron en una caja Petri con tapa (15 cm de diámetro) fijada horizontalmente a un mezclador de vórtice de laboratorio, a continuación, se añadieron 200 µl de la solución acuosa con  $1000 \pm 50$  JI, los materiales se mezclaron mediante la aplicación de un movimiento de rotación excéntrica en el máximo nivel durante 20 s.

### 2.9.2. Pelletizadora mecánica

Los JI fueron pelletizados mecánicamente en TD siguiendo el método descrito por Matadamas-Ortiz et al. (2014) quien uso una máquina que opera sobre el principio de flujo laminar de arcillas en conos convergentes (Espinosa-Rodríguez, 2005).

## 2.10. Almacenamiento de los pellets

Los pellets de TD con y sin JI se almacenaron a temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  y humedad relativa de 96%, utilizando una solución saturada de sulfato de potasio ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) en el interior del desecador (Winston y Bates, 1960). El monitoreo de las condiciones en el desecador se hizo con un registrador de datos de temperatura y humedad relativa.

## 2.11. Determinación del contenido de humedad del pellet

El contenido de humedad del pellet ( $CH_p$ ) fue calculado como una función de la masa húmeda y la masa seca con la siguiente ecuación:

$$CH_p = \left[ \frac{(masa\ húmeda\ (t) - masa\ seca)}{masa\ seca} \right] \cdot 100 \quad (2)$$

donde la masa húmeda ( $t$ ) es el peso del pellet obtenido de las mediciones diarias ( $t \geq 0$ ) durante el experimento. La masa seca es la diferencia entre la masa húmeda del pellet y la masa de la fase líquida que es  $\sim 0.20$  g (equivalente a una dosis de 200 µL de agua bidestilada).

### 2.1.2. Recuperación de la movilidad de los JI pelletizados

En forma individual, cada pellet se colocó en una caja Petri de 9 cm de diámetro y se rehidrato con 10 ml de agua bidestilada para disgregar su estructura y proporcionar la humedad necesaria a los JI para recuperar su movilidad. El tiempo proporcionado para recuperar la movilidad en agua fue de 15 min a 18 h en función del incremento del tiempo de supervivencia de los JI.

## 2.13. Ensayos de supervivencia de *S. glaseri*

Basado en el método propuesto por Chen and Glazer (2005), se toma una muestra de 200  $\mu$ l de la suspensión acuosa formada por el pellet disuelto para contar los nematodos vivos y muertos utilizando un microscopio estereoscópico, los JI que vivían eran móviles por sí mismos o cuando eran estimulados por una aguja.

## **2.14. Ensayos de infectividad**

### **2.14.1. Sobre larvas de *G. mellonella***

La infectividad de los JI se puso a prueba mediante la exposición de larvas de *G. mellonella* de acuerdo al método descrito por Chen and Glazer (2005). En una placa de 24 pocillos de 1.56 cm de diámetro se colocaron dos discos de papel de filtro (15 mm de diámetro; Whatman no. 413), después las larvas se pusieron individualmente en cada pocillo, se añadieron 100 ml con  $10 \pm 1$  JI del pellet disuelto. Las placas de Petri se sellaron con parafilm y mantuvieron en una incubadora a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . La mortalidad de los insectos se revisó 72 horas después de la inoculación.

### **2.14.2. Sobre larvas de *P. vetula***

La infectividad en los ensayos de envejecimiento y preaclimatación fue probada por la proporción de mortalidad conseguida en una muestra de larvas de gallina ciega (*P. vetula*) expuestas a JI, de acuerdo al procedimiento descrito por Chen and Glazer (2005). En cada pocillo de 1.56 cm de diámetro de una placa de 24 pocillos se colocaron dos discos de papel filtro (1.5 cm de diámetro; Whatman no. 413) y después la larva fue colocada individualmente. Se tomó una muestra de 100  $\mu$ L con un inculo de  $1000 \pm 50$  JI de la solución con el pellet disuelto y fue depositado en el pocillo. Las placas fueron selladas con parafilm para reducir el intercambio de humedad y mantenidas a temperatura ambiente de  $23 \pm 6^\circ\text{C}$  y humedad relativa de 50-85%. La mortalidad de los insectos fue evaluada 72 horas después de la aplicación.

La mortalidad de los insectos fue revisada 72 h después de la aplicación. Las larvas que tenían signos de infección por NEP se lavaron dos veces con agua bidestilada para eliminar los JI adheridos a ellas y se transfirieron a trampas White con papel filtro (diámetro de 60 mm; Whatman no. 1). Las larvas que seguían vivas fueron conservadas para otro periodo de observación de 72 h con revisión diaria de mortalidad. Se completaron tres periodos de observación.

### **2.14.3. Penetración de JI**

Las larvas de *P. vetula* con signos de infección por NEP fueron transferidas a nuevas placas de orificios con papel filtro húmedo para prevenir más penetración por JI al final del periodo de exposición. Inmediatamente, las larvas fueron diseccionadas por el método de digestión enzimática utilizando la enzima pepsina y observadas con un microscopio estereoscopio para realizar el conteo de JI dentro de cada larva (Stock & Goodrich-Blair, 2014). La tasa de penetración fue calculada por medio de la división del número de JI dentro del cadáver por el inóculo inicial. Después, el valor promedio de penetración en el total de las larvas diseccionadas para cada edad fue calculado.

### **2.15. Obtención del extracto de nopal *Opuntia ficus indica***

Los cladodios fueron procesados según la metodología de León-Martínez et al. (2014) modificada para el molido en licuadora si adición de agua para obtener el extracto líquido de nopal (MO), el producto obtenido fue filtrado en una criba de malla 100 para separar las partículas en suspensión y almacenado a 4°C hasta su utilización.

### **2.16. Caracterización reológica del extracto de nopal**

Los ensayos reológicos para determinar la viscosidad del extracto líquido se realizaron con un reómetro de esfuerzo controlado (Anton Paar®, modelo Physica MCR 301). El análisis de los datos se realizó utilizando el software Rheoplus/32 versión 3.00. El comportamiento reológico en flujo constante de cizallamiento se investigó para dispersiones con diferentes concentraciones de mucilago con tres repeticiones. En este caso se utilizó un cilindro concéntrico de doble hueco (Modelo DG26.7-SN21085). Los vacíos internos y externos fueron 0.418 y 0.464 mm, respectivamente. La temperatura se mantuvo constante a  $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$  por un sistema Peltier conectado a un baño de agua Julabo F-25. La velocidad de cizallamiento se varió desde 0.01 hasta  $600 \text{ s}^{-1}$ .

### **2.17. Preparación de la suspensión acuosa con extracto de nopal**

Sobre la base de un volumen de 20 ml se efectuó la combinación de distintos volúmenes de agua bidestilada y extracto líquido de nopal para obtener las suspensiones con concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 80, 90 y 100% y un tratamiento de Control a base de agua bidestilada sin adición del extracto líquido de nopal.

### **2.18. Proceso de modelación**

El siguiente procedimiento de modelación fue seguido: un modelo conceptual de la evaporación de humedad del pellet fue elaborado, después, el modelo conceptual fue expresado en una función diferencial y resuelto matemáticamente, se realizaron repetidas simulaciones numéricas cambiando las propiedades de flujo y se compararon los valores pronosticados con los experimentales usando un parámetro estadístico para encontrar el comportamiento teórico más cercano al comportamiento temporal experimental del contenido de humedad en el pellet.

### 2.19. Determinación del coeficiente de transferencia de masa $\hat{h}_m$ por convección natural

Primero, el número de Sherwood de una esfera bajo convección natural se calculó diariamente utilizando la ecuación siguiente (Sablani et al. 2006):

$$Sh(t) = 2 + 0.589Ra_L^{1/6} / \left[ 1 + \left( \frac{0.469}{Sc} \right)^{9/16} \right]^{4/9} \quad (3)$$

donde el valor de  $Sc = 6 \times 10^4$  y el número de Raleigh  $Ra_L$  se calcula diariamente ( $t \geq 0$ ) basado en la ecuación para calcular el número de Grashof (Karwe & Deo, 2011).

$$Ra_L(t) = Gr_L Sc = g\beta^*(CH_s(t) - CH_a)L^3/\nu D \quad (4)$$

donde  $g = 9.81 \text{ m/s}^2$ ,  $\beta^* = 1 \text{ m}^3/\text{kg}$ ,  $CH_a = 20.07 \times 10^{-3} \text{ kg/m}^3$  (calculado a  $23^\circ\text{C}$ , 96% HR y 1 atm de presión usando la ecuación CIPM-2007 Picard et al. (2008)),  $L = 1.66 \times 10^{-3} \text{ m}$ ,  $\nu = 1.563 \text{ m}^2/\text{s}$ ,  $D = 2.56 \times 10^{-5} \text{ m}^2/\text{s}$ . Después, se calculó el valor diario del contenido de humedad en la superficie del pellet  $CH_s(t)$  usando la ecuación

$$CH_s(t) = CH_p(t) \cdot \rho \quad (5)$$

donde  $CH_p(t)$  es el contenido de humedad diario del pellet ( $t \geq 0$ ) calculado en kg agua/kg materia seca y  $\rho$  es la densidad del pellet seco calculado en kg materia seca/ $\text{m}^3$  materia seca. La masa de materia seca es la diferencia entre la masa húmeda del pellet y la masa de la fase líquida, esta última es  $\approx 2.0 \times 10^{-4} \text{ kg}$  (equivalente a una dosis de 200  $\mu\text{l}$  de agua). De manera que el coeficiente de transferencia de masa  $h_m(t)$  para cada día del experimento se calcula con la ecuación

$$h_m(t) = Sh(t)D/L \quad (6)$$

Por último, con los valores diarios de  $h_m$  se calculó el coeficiente de transferencia de masa promedio  $\hat{h}_m$  en m/s usando la ecuación siguiente.

$$\hat{h}_m = \frac{\sum_1^t h_m}{t} \quad (7)$$

## 2.20. Determinación del error de modelación

Los valores pronosticados con los experimentales se compararon usando los parámetros desviación porcentual media relativa (valor  $P$ ) y para encontrar el comportamiento teórico más cercano al comportamiento temporal experimental del contenido de humedad en el pellet.

### 2.20.1. Desviación porcentual media relativa

Fue calculado con la siguiente ecuación:

$$P\% = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^N \frac{|\mu_{exp} - \mu_{pro}|}{\mu_{exp}} \quad (8)$$

donde  $\mu_{exp}$  y  $\mu_{pro}$  son los valores experimental y pronosticado del contenido de humedad (%) y  $n$  es el número de registros. Un modelo describe el fenómeno de manera aceptable si el valor de  $P$  es menor a 10% (Bazardeh & Esmaili, 2014).

### 2.20.2. Raíz del error cuadrático medio

Fue calculado con la siguiente ecuación:

$$RECM = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^i (CH_e - CH_c)^2}{n}} \quad (9)$$

Dónde  $CH_c$  es el contenido de humedad calculado con el modelo evaporativo o difusivo,  $CH_e$  es el contenido de humedad medido en los experimentos y  $n$  es el número de registros.

## 2.21. Análisis estadístico de los datos

### 2.21.1. Supervivencia de los JI

Los experimentos se realizaron por duplicado y cada ensayo se repitió 5 veces. Los resultados de las pruebas duplicadas se combinaron para el análisis final. El análisis de supervivencia se realizó con gráficos de Kaplan-Meier (Kaplan & Meier, 1958) en SigmaPlot® 12 (Systat Software, Inc, San José, CA, EE.UU.).

### 2.21.2. Infektividad por el envejecimiento de los JI

Los tres datos colectados de los ensayos de envejecimiento (edad, mortalidad de *P. vetula* y tasa de penetración de JI) fueron analizados. El análisis de correlación de Pearson fue hecho entre la edad de envejecimiento de los JI, la mortalidad de *P. vetula* y la tasa de penetración de JI con  $P < 0.05$ . Todos los análisis se realizaron en SigmaPlot® 12 (Systat Software, Inc., San José, CA, EE.UU.).

### 2.21.3. Ajuste de datos experimentales a una ecuación de aproximación

En este estudio se hicieron algunas comparaciones entre datos experimentales y ecuaciones matemáticas de curvas de tendencias mediante un procedimiento de ajuste de datos con el software SigmaPlot® para mostrar asociaciones matemáticas entre variables.

## 2.22. Proceso de diseño

Se usó el proceso de diseño propuesto por (Haik et al. 2010) para determinar las especificaciones de desempeño de un formulado con nematodos *S. glaseri*. Este proceso comprende la detección del problema, identificación de la necesidad, el estudio de mercado para buscar posibles soluciones. Si no se encuentra una solución en el mercado, entonces, determinar los requerimientos de diseño de los usuarios y darles un valor de importancia; Para ello se consideran las aportaciones de una muestra de los usuarios (personas que ejecutan alguna(s) de las fase(s) del proyecto) para establecer los detalles del producto en las primeras etapas de su diseño. Esta estrategia de diseño permite ahorrar tiempo en las modificaciones que pudieran hacerse durante el proceso de materialización del producto con NEP. Los usuarios fueron seleccionados por tener experiencia mínima de 3 años en el uso o la investigación de agentes entomopatógenos. Este grupo quedó formado por 4 usuarios.

Después, se construyó el árbol de objetivos del formulado, se hizo el diagrama de la función general y se elaboró la estructura funcional del formulado. El último paso en la definición del problema es determinar las especificaciones de desempeño del nuevo diseño para continuar ofreciendo clarificación adicional de la declaración de necesidad antes de comenzar a sugerir posibles soluciones.

## CAPÍTULO 3 Análisis del transporte de humedad en pellets de TD

La pregunta de investigación es: ¿Cómo ocurre el transporte de humedad en el pellet de TD? y el objetivo de este enfoque experimental fue analizar la pérdida de la humedad de los pellets de TD almacenados a temperatura ambiente mediante modelos matemáticos de transporte de humedad en medios porosos.

### 3.1. Transporte temporal de la humedad por evaporación y difusión

La hipótesis de trabajo es: si el pellet de TD es una estructura que pierde y gana humedad con la atmosfera circundante y se almacena bajo las condiciones del ambiente, entonces la pérdida de humedad del pellet ocurre por los procesos de difusión interna y evaporación externa. Se evaluó un modelo simple de transferencia de humedad por difusión y evaporación en la superficie para describir el comportamiento temporal del contenido de humedad en pellets de TD elaborados para contener NEP, almacenados a  $23 \pm 3^\circ\text{C}$  y 96-100% HR.

#### 3.1.1. Resultados

*Modelo matemático del transporte de humedad.* Los siguientes supuestos de simplificación fueron considerados: el pellet es un cuerpo esférico homogéneo de radio  $r$ , el sistema comprende una fase sólida no deformable; el material de la fase sólida es higroscópico e isotrópico; y una fase líquida sin cambio de fase, de manera que la masa de vapor de agua presente en los poros del pellet es despreciable en comparación a la masa de líquido.

No hay fuente interna o externa de calor, la atmosfera que circunda al pellet se encuentra a temperatura ambiente y HR constantes, la temperatura del medio poroso es igual a la temperatura de la atmosfera que le circunda. Se asume que el transporte de la humedad dominante dentro del pellet es la difusión unidimensional transitoria en un medio poroso y se describe por la segunda Ley de Fick (Shackelford & Moore, 2013), el coeficiente de difusión  $D$  es igual y constante en todas las direcciones y el sistema es libre de reacciones químicas.

Las condiciones iniciales y de frontera son: el pellet esta inicialmente a una concentración de contenido de humedad uniforme y la condición superficial es de evaporación desde la superficie del pellet al aire circundante. De manera que la difusión radial en el pellet es gobernada por una condición de evaporación superficial expresada como:

$$-D \partial CH / \partial R = h(CH_p - CH_0) \quad (10)$$

donde  $D$  es el coeficiente de difusión de la humedad en el sólido en  $cm^2/s$ ,  $\partial CH/\partial R$  es el gradiente de concentración de humedad en dirección radial,  $h$  es el coeficiente de transferencia de masa desde el pellet hacia la atmósfera circundante en  $cm/s$ ,  $CH_p$  es contenido de humedad del pellet en % y  $CH_0$  es el contenido de humedad requerido para mantener el equilibrio con la atmósfera circundante en %.

Los supuestos de simplificación utilizados en el modelo matemático son: el sistema es dependiente del tiempo ( $t$ ) y la transferencia de humedad unidimensional en la dirección radial ( $R$ ). La Figura 3 muestra un esquema del modelo de transferencia de la humedad y la ecuación diferencial del fenómeno.

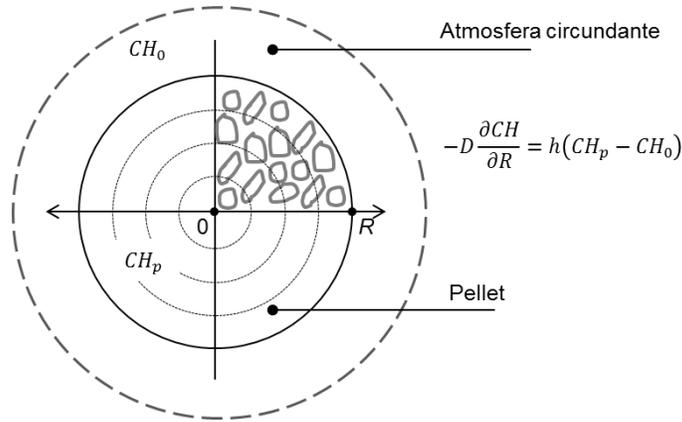


Figura 3. Modelo de transporte de humedad unidimensional en el pellet basado en la condición de difusión y evaporación superficial.

Basado en la solución desarrollada por Crank (1975), el contenido de humedad que sale del pellet en cualquier momento ( $t$ ) viene dada por la siguiente ecuación.

$$CH(t) = CH_1 + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6L^2 \exp(-\beta_n^2 Dt/R^2)}{\beta_n^2 \{\beta_n^2 + L(L-1)\}} (CH_0 - CH_1) \quad (11)$$

donde  $CH(t)$  es el contenido actual de humedad dentro del Pellet en %,  $CH_1$  es el contenido de humedad inicial en el Pellet en % y  $CH_0$  es el contenido de humedad requerido para mantener el equilibrio con el aire que circunda al pellet en %, el número de Biot de transferencia de masa  $L = hR/D$ ,  $R$  es el radio del pellet en cm, y  $\beta_n$ , son la raíces de

$$\beta_n \cot \beta_n + L - 1 = 0 \quad (12)$$

La Ec. (11) solicita 8 datos de entrada.

$$E = \{R, CH_1, CH_0, n, \beta_n, L, h, D\} \quad (13)$$

Los valores de las incógnitas de la Ecuación 5 que fueron determinados experimentalmente son: el radio  $R$  del pellet, que fue de 0.5 cm (basado en la geometría del pellet producido para los experimentos de secado),  $CH_1$  de 66.67% (basándose en la relación de 0.20 g de agua bidestilada y 0.30 g de TD) y  $CH_0$  del pellet de 13.58 y 13.33 %, respectivamente. El valor de  $n$  fue de 1 a 5 porque se usaron los cinco términos de la serie en la Ec. (3). Los valores de  $\beta_n$  se seleccionaron de la tabla de Crank (1975).

*Simulación.* Después de realizar varias iteraciones se encontró que:  $D = 2.747 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ ,  $h = 5.494 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ ,  $L = 1$  y el valor de  $P$  entre los valores experimentales de contenido de humedad del pellet y sus valores pronosticados fue de 21.95%. La comparación entre los valores experimentales de contenido de humedad del Control y sus valores pronosticados después de varias iteraciones entrego los siguientes datos,  $D = 2.747 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ ,  $h = 2.747 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ,  $L = 5$  y valor de  $P$  de 11.39%. La Figura 4 muestra el comportamiento de los valores experimental y pronosticado del contenido de humedad en el pellet y el Control por los 10 días que duro el experimento.

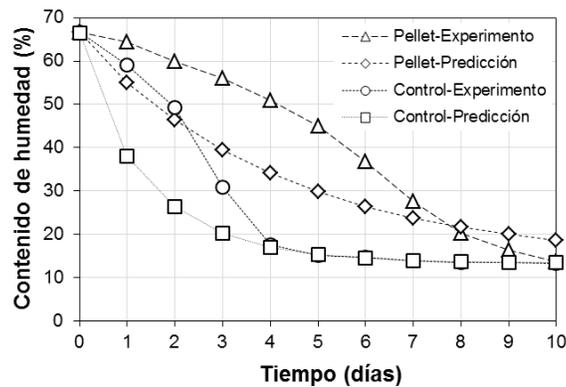


Figura 4. Comportamiento experimental y pronosticado del contenido de humedad en el pellet y el Control por un modelo de difusión- evaporación a  $23 \pm 3^\circ\text{C}$  y 96-100% HR.

El tiempo requerido para desecar el pellet hasta el contenido de humedad de equilibrio fue de 10 días y del Control fue de 6 días. De manera que la tasa de pérdida de humedad del pellet y del Control fue de 5.3% y de 10.6% por día, respectivamente.

### 3.1.2. Discusión

El modelo de transferencia de humedad estima el comportamiento temporal del contenido de humedad en pellets unidos por la cohesión entre las partículas a granel de TD. Sin embargo, el valor

de  $P$  entre los valores experimental y pronosticado del contenido de humedad en el pellet y el Control son mayores a 10%, por lo tanto, el modelo describe parcialmente el fenómeno de la pérdida de humedad del pellet. A continuación, se discuten cuatro supuestos simplificadores del modelo que podrían estar “relajados”.

El primer supuesto es que la transferencia de humedad dentro del pellet sucede por difusión. La teoría sugiere que en la migración interna de agua en un cuerpo poroso también participa la capilaridad, aunque en menor medida que la difusividad (Zhang & Datta, 2004), pero que la dirección del flujo de humedad puede variar negativamente o positivamente. Además, el coeficiente de difusión  $D$  también está sujeto a la variación de la morfología del pellet, como la porosidad  $\eta$  y tortuosidad  $\tau$ , que determinan el coeficiente de difusión efectivo  $D_{eff}$  y la distribución del tamaño de partícula que produce su microestructura. Una mejora en el modelo podría ser integrar la variación de la porosidad del pellet debido a la compactación mecánica, lo que conduciría a determinar la variación del coeficiente de difusión efectivo y su relación con la tasa de pérdida de humedad y el contenido de humedad, tal como señalan Derouane et al. (1988) y Kelbaliev and Manafov (2009). Además, el "flujo" o "movilidad"  $\alpha$  es un factor que tiene en cuenta el aumento de la viscosidad de las partículas de agua adyacentes a la superficie de los minerales de arcilla y tiende a reducir la tasa del transporte difusivo de solutos al suelo (Shackelford & Moore, 2013).

El segundo supuesto es el patrón uniforme en la distribución uniforme del contenido de humedad en el pellet. Como se muestra en la comparación de la Figura 4, la velocidad inicial de pérdida del contenido de humedad durante los primeros días es más lenta en el pellet y el Control, comparados con sus pronósticos. Probablemente, el contenido de humedad en el pellet y el Control se concentra inicialmente en el núcleo, bajo esta condición, en las primeras días el sistema equilibra el contenido de humedad desde el centro hasta la superficie y cuando lo consigue el proceso de transferencia de humedad con el medio circundante sucede con mayor rapidez.

El tercer supuesto se refiere a que el medio circundante se encuentra a temperatura y HR constantes y debe replantearse como variables por las siguientes razones probables: bajo las condiciones en que se desarrolló el experimento la temperatura presentó variaciones ( $23 \pm 3^\circ\text{C}$ ) y la masa de agua que el pellet perdió se transfirió al medio circundante, influyendo de esta manera en la presión de vapor de agua en el ambiente circundante, con efecto en el coeficiente transferencia de masa  $h$  y el contenido de humedad de equilibrio.

El cuarto supuesto del modelo es que el fenómeno está libre de reacciones químicas. Por ahora, la escasa información disponible sobre la naturaleza química de las excreciones de *S. glaseri* y su reacción con los materiales del pellet apoya su independencia con el flujo de humedad. Se requieren experimentos de secado de pellet y el análisis químico de los componentes de las excreciones para afirmar o rechazar esta hipótesis. De cualquier manera, hemos mantenido los supuestos simplificadores anteriores, ya que por ahora los datos disponibles parecen insuficientes para distinguir de forma fiable entre sus efectos.

Los resultados de esta investigación justifican los esfuerzos por tratar de intervenir en el régimen de desecación de los IJ reduciendo la pérdida de humedad del pellet por medio del recubrimiento del núcleo y la superficie del pellet con agentes naturales gelificantes o el almacenamiento bajo condiciones atmosféricas controladas. No obstante, esta estrategia contribuye parcialmente en el mejoramiento de la estabilidad de almacenamiento, porque también se necesita conocer los regímenes de desecación requeridos para inducir a la anhidrobiosis a cada especie de NEP y desarrollar métodos para revertir la anhidrobiosis, liberar los IJ del pellet y potenciar su patogenicidad contra la plaga objetivo (Georgis, 2002; Hernández et al. 2009; San Blas, 2013; Matadamas-Ortiz et al. 2014).

El presente trabajo es también el primer paso del modelamiento matemático de los fenómenos de transferencia de masa y energía en el pellet, para que este proceso sea mejorado y eventualmente incorporado al método experimental de desarrollo de la formulación, como una herramienta para su optimización en la etapa de diseño del pellet y el desarrollo de tecnología de pelletización para el almacenamiento y aplicación directa de NEP sobre el suelo para el control de insectos plaga en cultivos de importancia agrícola.

### **3.2. Transporte temporal de la humedad por convección natural y difusión**

La hipótesis de trabajo es que si el pellet de TD es una estructura que pierde y gana humedad con la atmosfera circundante y se almacena bajo las condiciones del ambiente, entonces la pérdida de humedad del pellet de TD ocurre por los procesos de convección natural y difusión molecular. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue analizar el comportamiento del CH del pellet de TD usando un modelo matemático de transporte de humedad donde los gradientes de CH son usados como indicadores de las fuerzas que regulan la tasa de pérdida de humedad. Las condiciones límite fueron estimadas considerando los ambientes experimentales.

### 3.2.1. Resultados

*Modelo matemático de transporte de humedad.* El método de identificación de sistemas fue seguido para realizar la modelación, el cual se lleva a cabo mediante un proceso iterativo (Bear & Cheng, 2010; Ljung, 1999). Consiste en elaborar una un modelo conceptual del fenómeno de transporte de humedad en el pellet por medio de supuestos del material, el fenómeno y el modelo. Después, el modelo conceptual se expresó en una forma matemática de tipo continua que fue resuelta. Con el modelo se calcula periódicamente el contenido de humedad del pellet.

Consideramos un medio poroso esférico homogéneo de radio  $r$ , el sistema consta de dos fases: una fase solida no deformable y una fase liquida que no cambia de estado por lo que la masa de vapor de agua presente en los poros es despreciable comparada con la masa de líquido, el material de la fase solida es higroscópico, poroso e isotrópico. La atmosfera que circunda al pellet es mantenida a temperatura y humedad relativa constantes.

Consideraciones: No hay fuente de calor interna, al inicio la temperatura en el pellet es constante e igual a la temperatura de la atmosfera circundante. Se supone el transporte de humedad en el pellet por difusión transitoria unidimensional de una especie química en un medio poroso y se describe por la segunda ley de Fick (Shackelford & Moore, 2013). El medio es anisotrópico y el proceso evaporativo en la superficie ocurre por convección. La Figura 5 presenta un esquema del pellet y las ecuaciones diferenciales que representan el fenómeno de transferencia de humedad basado en gradientes de contenido de humedad.

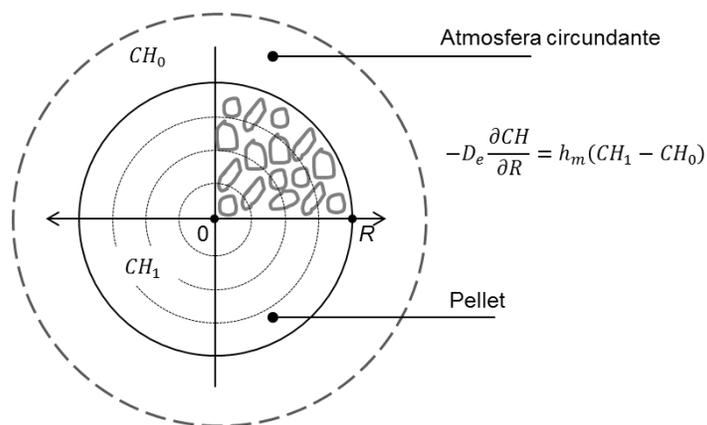


Figura 5. Modelo de transporte de humedad unidimensional en el pellet basado en la condición de difusión y convección natural.

La transferencia de masa es impulsada por la diferencia de concentración de humedad entre la superficie del pellet y el aire que lo circunda y se conoce como condición de evaporación en la superficie (Holman, 1998). La ecuación diferencial de la difusión radial de humedad en una esfera de radio  $R$  bajo estas condiciones es:

$$-D_e \partial CH / \partial R = h_m (CH_1 - CH_0) \quad (14)$$

donde  $D_e$  es el coeficiente de difusión efectivo (Ecuación 9), el cual es producto del coeficiente de difusión  $D_0$  de agua en solución acuosa ( $\text{m}^2/\text{s}$ ) por la porosidad  $\varepsilon$  del pellet ( $0 \leq \varepsilon \leq 1$ ) y el factor de tortuosidad  $\tau_a$  ( $\tau_a \leq 1$ ) (Shackelford & Moore, 2013).  $\partial CH / \partial R$  es el gradiente de concentración de humedad en dirección radial,  $h_m$  es el coeficiente de transferencia de masa desde el pellet hacia la atmósfera circundante en  $\text{m/s}$ ,  $CH_1$  es contenido de humedad del pellet y  $CH_0$  es el contenido de humedad requerido para mantener el equilibrio con la atmosfera circundante.

$$D_e = \varepsilon D_0 \tau_a \quad (15)$$

El valor de  $\tau_a$  fue calculado con la relación teórica tortuosidad-porosidad para bentonita compactada  $\tau_a = \varepsilon^{5.4}$  (Shackelford & Moore, 2013). El valor calculado fue  $\tau_a = 0.1761$ . Para calcular  $D_0$  consideramos el valor propuesto del coeficiente de difusión del agua en aire  $D = 2.56 \times 10^{-5} \text{ m}^2/\text{s}$  y utilizando un método inverso, tenemos que  $D_0 = 13.76 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$ . Después, basado en la solución analítica desarrollada por Crank (1975), el contenido de humedad que sale del pellet en cualquier momento ( $t$ ) está dado por la siguiente ecuación.

$$CH(t) = CH_1 + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6Bi_m^2 \exp(-\beta_n^2 D t / R^2)}{\beta_n^2 \{\beta_n^2 + Bi_m(Bi_m - 1)\}} (CH_1 - CH_0) \quad (16)$$

donde  $CH(t)$  es el contenido actual de humedad en el pellet en un instante determinado,  $t$  es el tiempo en s,  $CH_1$  es el contenido de humedad inicial en el pellet y  $CH_0$  es el contenido de humedad requerido para mantener el equilibrio con la atmosfera que circunda al pellet, el número de Biot de transferencia de masa  $Bi_m = \hat{h}_m R / D_e$  donde  $R$  es el radio del pellet en cm.  $\beta_n$  son la raíces de

$$\beta_n \cot \beta_n + Bi_m - 1 = 0 \quad (17)$$

la Ecuación (4) solicita 11 datos de entrada.

$$E = \{t, R, CH_1, CH_0, n, \beta_n, Bi_m, \hat{h}_m, D_e, \tau_a, \varepsilon\} \quad (18)$$

El proceso de simulación con el modelo evaporativo fue realizado en Excel<sup>®</sup> 2010 para Windows y la simulación con el modelo difusivo fue realizado con el programa COMSOL<sup>®</sup> para Windows.

**Ajuste de los valores de  $\beta_n$  a una ecuación de aproximación.** Los valores de  $\beta_n$  fueron tomados de la tabla de Crank (1975) y ajustados con el software SigmaPlot® a una ecuación que describe su tendencia (Tabla 1), para después calcular los valores de  $\beta_n$  que no están reportados (p. 381) y son solicitados en la Ecuación 17.

Tabla 1. Ecuaciones de aproximación de los valores de  $\beta_n$  para  $n = 1, 2, 3, 4$  y  $5$  y  $0 \geq Bi_m \leq 100$ .

Ecuación	$y_0$	$a$	$b$	$c$	$R^2$
$\beta_1(Bi_m) = y_0 + aBi_m/(b + Bi_m)$	0.1575	2.9320	1.0035	-	0.994
$\beta_2(Bi_m) = y_0 + a(1 - b^{Bi_m})$	4.4977	1.7132	0.8762	-	0.999
$\beta_3(Bi_m) = (1 + aBi_m)/(b + cBi_m)$	-	0.1261	0.1297	0.0133	0.998
$\beta_4(Bi_m) = (1 + aBi_m)/(b + cBi_m)$	-	0.0811	0.0918	0.0064	0.998
$\beta_5(Bi_m) = (1 + aBi_m)/(b + cBi_m)$	-	0.0580	0.0711	0.0037	0.999

Los valores de  $\beta_n$  para  $100 > Bi_m < \infty$  fueron tomados de la tabla de Crank [31] como  $\beta_1 = 3.1416$ ,  $\beta_2 = 6.2832$ ,  $\beta_3 = 9.4248$ ,  $\beta_4 = 12.5664$  y  $\beta_5 = 15.708$ .

**Datos de entrada.** Los valores de las incógnitas de la Ecuación 6 que fueron determinados experimentalmente fueron: el radio  $R$  de la esfera de 0.005 m (basado en la geometría del pellet producido para los experimentos de secado),  $CH_1$  de 1.0,  $CH_0$  de 0.30 y  $\hat{h}_m$  de  $3.75 \times 10^{-6}$  m/s. El valor de  $n$  fue de 1 a 5 porque se usaron los 5 términos de la serie en la Ecuación 11. El parámetro de ajuste del modelo evaporativo a la curva experimental fue  $D$ .

**Simulación.** En la Figura 6 se muestra el comportamiento experimental del contenido de humedad del pellet de TD y los comportamientos pronosticados por el modelo de evaporación y por el modelo difusivo. En las simulaciones numéricas con el modelo evaporativo (Ecuación 10), el valor de  $D_e$  se encuentra en el rango de  $9.375 \times 10^{-12}$  a  $9.375 \times 10^{-9}$  m<sup>2</sup>/s (Tabla 2). En las simulaciones numéricas con el modelo difusivo el valor de  $D_e = 1.76 \times 10^{-7}$  m<sup>2</sup>/s.

El valor de RMSE entre los datos experimentales y los datos pronosticados por el modelo evaporativo fue 0.0621. Teóricamente el pellet consigue llegar al  $CH_0$  hasta el décimo día y experimentalmente lo hace en el octavo día del proceso de desecación. La Tabla 2 muestra los datos de la simulación en un periodo de 10 días. El valor de RMSE entre los datos experimentales y los

datos pronosticados por el modelo difusivo fue 0.0680. Con este modelo, se llega al  $CH_0$  del pellet hasta el décimo día.

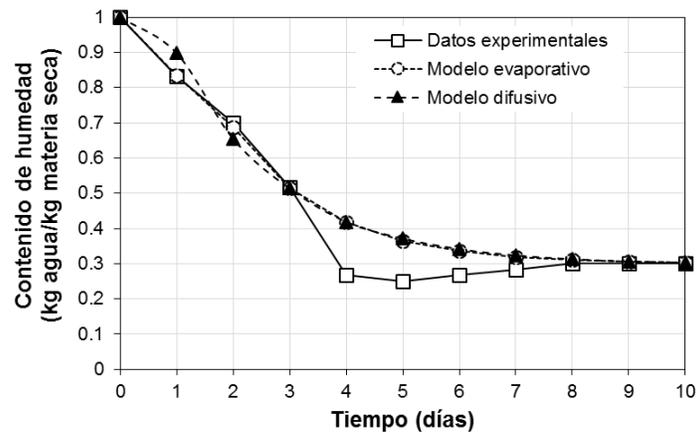


Figura 6. Cinéticas de humedad en pellets de TD, almacenados a 23°C y 96% HR. Datos experimentales (□) y simulaciones por el modelo evaporativo (○) y por el modelo difusivo (▲).

Tabla 2. Valores diarios del coeficiente de difusión, número de Biot, contenido de humedad pronosticado por el modelo evaporativo y medido experimentalmente en pellets de TD almacenados a 23°C, 96% HR y 1 atm de presión.

Día	$D$ (m <sup>2</sup> /s)	$D_e$ (m <sup>2</sup> /s)	$Bi_m$	$CH_c$ (kg agua/kg materia seca)	$CH_e$ (kg agua/kg materia seca)
0	2.277E-09	9.375E-09	2	0.9995	1.000
1	3.795E-13	1.563E-12	12000	0.8342	0.833
2	2.277E-12	9.375E-12	2000	0.6866	0.700
3	6.072E-12	2.5E-11	750	0.5132	0.517
4	6.072E-12	2.5E-11	750	0.4176	0.267
5	6.072E-12	2.5E-11	750	0.3648	0.250
6	6.072E-12	2.5E-11	750	0.3357	0.267
7	6.072E-12	2.5E-11	750	0.3197	0.283
8	6.072E-12	2.5E-11	750	0.3109	0.300
9	6.072E-12	2.5E-11	750	0.3060	0.300
10	6.072E-12	2.5E-11	750	0.3033	0.300

### 3.2.2. Discusión

La pérdida de humedad del pellet de TD ocurre por los procesos de convección natural y difusión molecular (RMSE = 0.0680). El comportamiento experimental de la humedad del pellet que se observa en la Figura 2 parece representar un proceso de secado para materiales porosos con alto contenido de humedad (Gornicki & Kaleta, 2011). Esta teoría propone que el proceso de secado se desarrolla por dos procesos de transporte. En el primero, el proceso de secado sucede por convección en la superficie del material y los factores que intervienen en su desarrollo son las condiciones externas de intercambio de masa y calor en el sistema relacionadas con las propiedades del aire circundante (temperatura, presión, humedad y velocidad). El segundo periodo de secado empieza cuando el contenido de humedad del cuerpo es menor que su contenido de humedad crítico. En este periodo el proceso es influenciado por factores internos, parámetros como difusividad de la humedad, actividad de agua, estructura, composición, entre otros.

El decaimiento del contenido de humedad hasta 0.25 y la posterior recuperación hasta 0.30 que se observa en la curva experimental de desecación del pellet puede estar relacionado con un cambio complejo en la microestructura del pellet que afecta el proceso de difusión interna de agua en el pellet de TD. En particular, tal vez debido a los cambios en la porosidad, tortuosidad y el agrietamiento del pellet, pues es bien sabido que la porosidad de este tipo de materiales puede permitir un fenómeno de re-absorción de humedad debido al efecto de doble porosidad.

*Porosidad del pellet.* La porosidad es una propiedad primaria clave de los gránulos que domina una amplia gama de propiedades secundarias importantes (Litster & Ennis, 2004). Bajo esta premisa, se ha investigado la mezcla de TD y arcilla atapulgita y su efecto en el tiempo de supervivencia de los JI en pellets de TD. Se ha propuesto que la variación de la forma de las partículas de estos materiales y su distribución de tamaño determinó la porosidad total del pellet y se plantea que la compactación en el proceso mecánico de conformación del pellet influye en el cambio de la relación entre el material sólido, canales, capilares y poros (Matadamas-Ortiz et al. 2014). De lo anterior, se infiere que la reducción de la porosidad del pellet tiene un efecto positivo en la reducción de la pérdida de humedad y el aumento de la supervivencia del nematodo entomopatógeno *S. glaseri*.

La vista interna de un pellet de TD (10 mm de diámetro) muestra las partículas y poros que dan forma a una microestructura sin un ordenamiento evidente y también se aprecia dos distribuciones

de tamaño de poro (Figura 7). Luego, la TD en su forma agregada tiene comúnmente dos distintas distribuciones, una para la región de porosidad macroscópica (entre las partículas), y otra para la región de porosidad microscópica (dentro de las partículas).

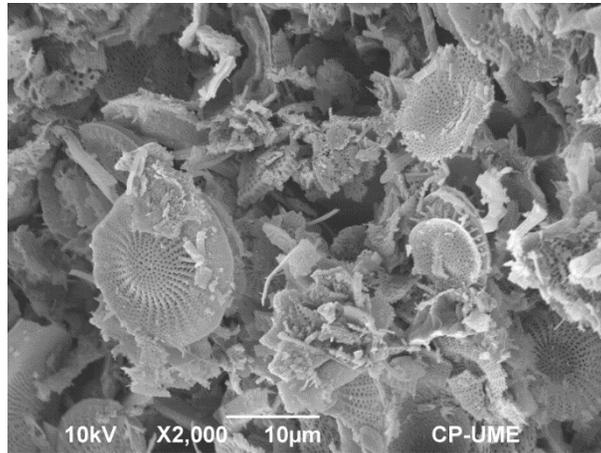


Figura 7. Imagen obtenida por microscopia electrónica de barrido del interior de un pellet de TD (Celite® 209) elaborado mecánicamente. Imagen reproducida con autorización del autor (Cruz-Martínez, 2010).

En pellets de TD (2 mm de diámetro) sometidos a un proceso de calcinación a 980°C, la porosidad total fue de 0.725 (100 %), de la cual la parte correspondiente a la macroporosidad fue 0.420 (47.9%) y la microporosidad fue 0.348 (52.1%) y lo que sucede con un poro pequeño es que provoca una presión capilar grande que causa la succión de agua (Burger & Shackelford, 2001). Por lo anterior, es posible que en la medida que se aumente la microporosidad del pellet de TD, la tasa de transferencia de humedad por difusión en el pellet decrezca y aumenté la retención de humedad.

*Agrietamiento del pellet.* Además, en el quinto día del proceso de desecación se observaron grietas en la superficie el pellet de TD, este hecho coincide con el registro que indica el decaimiento de la humedad más allá del valor de equilibrio. Entonces, la deformación de la estructura del pellet de TD podría ser otro factor relacionado con la perdida acelerada de la humedad, a escala micro, con el cambio en las dimensiones de los huecos de la microestructura, fenómeno que se presenta cuando la tasa de transferencia de humedad decrece, provocando un aumento en la presión capilar, lo que genera fracturas internas en la microestructura que provocan el agrietamiento del pellet. Puesto que en los poros más pequeños, la succión que el menisco capilar puede soportar antes de que el aire entre en ellos cuando se presenten fracturas será mayor (François & Ettahiri, 2012).

*Temperatura del pellet.* El efecto de la temperatura del pellet sobre la curva de retención de agua es un fenómeno complejo de explicar, ya que es la consecuencia de varios mecanismos físicos que actúan en la escala de las partículas. Estos fenómenos están relacionados con el papel de la temperatura en los mecanismos capilares, en la interacción sólido-líquido de corto alcance o sobre los mecanismos de cambio de fase (Romero et al. 2003, François & Ettahiri, 2012), porque un cambio en la temperatura induce una modificación de las propiedades de las diferentes fases y también de sus interfaces.

En primer lugar, el agua se dilata más que el esqueleto sólido, por tanto, la fase de agua ocupa proporcionalmente más espacio poroso cuando aumenta la temperatura, con efecto en el grado de decremento de la saturación por esta variación. Sin embargo, este efecto se amortigua con el tiempo cuando se alcanza un nuevo equilibrio después de la difusión del exceso de agua en los huecos.

Por ejemplo, durante el calentamiento del suelo, la disminución térmica de la solubilidad del aire en el agua produce la liberación de una cantidad de aire desde el agua. En consecuencia, puede disminuir la proporción de agua en los huecos. Sin embargo, a través de la difusión de aire, este efecto también puede disiparse con el tiempo o puede considerarse sin efecto en la tasa de evaporación de humedad si la temperatura del agua que se evapora es baja, puesto que vaporizara muy lentamente (Shaw et al. 2011).

Un efecto bien conocido está relacionado con la disminución térmica de la tensión superficial entre las fases de aire y agua. A través de la ecuación de Young-Laplace se ha demostrado que la disminución de la tensión superficial de agua-aire con la temperatura disminuye el radio del menisco. Como consecuencia, algunos poros que estaban a temperatura ambiente llenos de agua se pueden drenar a temperatura elevada. Esto hace que el grado de saturación del pellet disminuya.

*Supuestos de modelación.* El modelo de transporte de humedad por evaporación realiza la predicción temporal del transporte de humedad en pellets porosos que se asumen formados por la cohesión entre las partículas de TD a granel. La ecuación está basada en el flujo de humedad por diferencia de concentración de humedad entre la superficie del pellet y el aire circundante bajo condiciones ideales (sin fuentes de variación). Siete variables operan en el modelo para reproducir la pérdida de humedad del pellet. Sin embargo, atendiendo a los factores previamente discutidos, el modelo hace varios supuestos simplificadores que son susceptibles de ser evaluados para determinar su efecto en la pérdida acelerada de la humedad del pellet.

El primer supuesto es la homogeneidad de la microestructura del pellet. Un posible mejoramiento podría ser representar la heterogeneidad en la estructura porosa del pellet por efecto de la mezcla de materiales y la compactación de la superficie del pellet debido a la rodadura en el proceso de pelletización mecánica, lo que generaría variación la microporosidad y macroporosidad de la microestructura del pellet, el coeficiente de difusión efectiva de humedad y la tasa a la cual la humedad del pellet se va transportando, primero dentro del pellet y luego hacia la atmosfera circundante. Derivado de esta variación, también el supuesto de una distribución uniforme del contenido de humedad en el pellet debe ser revisado.

Un tercer supuesto del modelo es que el movimiento de la humedad al interior del pellet depende de la difusión. La teoría sugiere que la migración interna del agua en un cuerpo poroso también puede suceder por capilaridad, aunque en menor medida. De manera que la dirección de flujo de humedad puede variar negativamente o positivamente.

### **3.3. Transporte espacial y temporal de la humedad**

La pregunta de investigación de este experimento de simulación del transporte de humedad es: ¿Cómo la composición del pellet influye en la retención de humedad? La hipótesis de trabajo es que la mezcla de materiales para modificar la porosidad del pellet, la adición de agentes gelificantes y el recubrimiento de la superficie no cambian la cantidad de humedad que el pellet puede retener. Para probar el efecto de la porosidad, el incremento de viscosidad en la fase líquida y el grado de recubrimiento superficial en la migración de humedad del pellet se diseñó un experimento de simulación numérica multifactorial. El efecto de la porosidad con cinco niveles (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1), el grado de incremento de la viscosidad sobre la fase líquida con cinco niveles (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0) y el grado de recubrimiento superficial con cinco niveles (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0). En todas las simulaciones los valores de temperatura y HR, fueron 23°C y 96%, respectivamente.

#### **3.3.1. Resultados**

*Modelo matemático de transporte de humedad.* Se tomaron en consideración los siguientes supuestos sobre la estructura del pellet para elaborar el modelo matemático: se trata de un medio esférico homogéneo de radio  $r$ , el sistema consta de dos fases: una fase sólida no deformable y una fase líquida que no cambia de fase por lo que la masa de vapor de agua presente en los poros es despreciable comparada con la masa de líquido, el material de la fase sólida es higroscópica, poroso e isotrópico. El pellet se encuentra circundado por aire a cierta temperatura y HR. La Figura 8

presenta un esquema del pellet y las ecuaciones diferenciales parciales que representan el fenómeno de transferencia de humedad basado en gradientes de contenido de humedad.

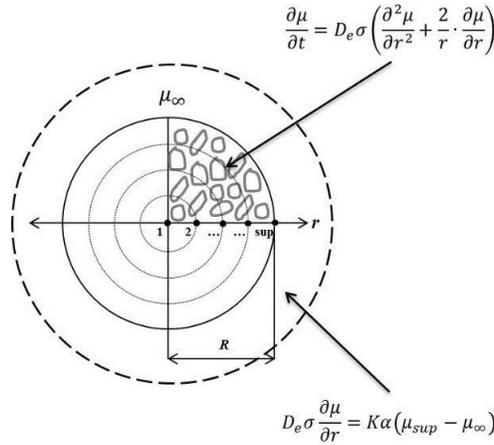


Figura 8. Transferencia de humedad unidimensional en pellets de TD basado en gradientes espaciales de contenido de humedad.

Los supuestos del fenómeno son: sin fuente de calor interna o externa, la temperatura en el medio poroso es constante e igual a la temperatura del aire que le circunda. Se supone el transporte de humedad en el interior del pellet por difusión transitoria unidimensional de una especie química en un medio poroso y se describe por la segunda ley de Fick (Shackelford & Moore, 2012) y evaporación de agua de la superficie del agregado hacia el aire circundante, libre de reacciones químicas. El coeficiente de difusión  $D$  es igual y constante en todas las direcciones y se desprecia el término gravedad. Los supuestos simplificadores utilizados en el modelo matemático son: el sistema es dependiente del tiempo ( $t$ ) y transferencia de humedad unidimensional en dirección radial ( $r$ ).

La ecuación diferencial para la difusión radial de humedad en el centro de una esfera de radio  $R$ , se presenta enseguida:

$$\frac{\partial CH}{\partial t} = 3D_e \sigma \frac{\partial^2 CH}{\partial r^2} \quad (19)$$

En puntos distintos al origen y la superficie del pellet, tenemos que:

$$\frac{\partial CH}{\partial t} = D_e \sigma \left( \frac{\partial^2 CH}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial CH}{\partial r} \right) \quad (20)$$

donde  $CH$  es el contenido de humedad (%),  $t$  es el tiempo en que sucede el cambio en la concentración de humedad (s),  $r$  es la distancia de transporte (cm),  $D_e$  es el coeficiente de difusión

efectivo (Ecuación 14), el cual es producto de coeficiente de difusión  $D$  de agua libre ( $\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ ) por la tortuosidad  $\tau$  comprendida de  $\tau \leq 1$  y la porosidad  $\varepsilon$  del medio poroso ( $0 \leq \varepsilon \leq 1$ ) (Shackelford & Moore, 2013), y  $\sigma$  que es un factor de movilidad por efecto del aumento de la viscosidad de la fase líquida ( $0 \leq \sigma \leq 1$ ).

$$D_e = \frac{D\tau}{\eta} \quad (21)$$

La transferencia de humedad desde la superficie del pellet hacia el aire que lo circunda se rige por el flujo de humedad por gradientes de concentración y se conoce como una condición de evaporación en la superficie (Holman, 1998) y se expresa por la siguiente ecuación diferencial:

$$D_e\sigma \frac{\partial CH}{\partial r} = h_m(1 - \alpha)(CH_{sup} - CH_\infty) \quad (22)$$

Dónde  $h_m$  es el coeficiente de transferencia de masa ( $\text{cms}^{-1}$ ),  $\alpha$  es el grado adimensional de recubrimiento de la superficie ( $0 \leq \alpha \leq 1$ ). Si es extremadamente recubierto, el correspondiente grado de recubrimiento es 1, y es igual a 0 si la superficie no está recubierta,  $CH_{sup}$  es el contenido de humedad en la superficie del cuerpo (%) y  $CH_\infty$  es el contenido de humedad de equilibrio del pellet (%).

Usando una malla rectangular definida por  $\delta r$  y  $\delta t$ , se calcula la solución de diferencias finitas por el método explícito para  $0 \leq r \leq R$ ,  $t > 0$  basado en el procedimiento descrito por Smith (1985). En primer lugar, se establecen la ecuación diferencial de flujo de humedad para instantes en el tiempo  $i \geq 2$  y la posición de inspección  $j = 1$  (correspondiente al origen). Obtenemos la expresión que permite calcular  $CH$ .

$$CH_{i,j} = CH_{i-1,j} + 6rD_e\sigma(CH_{i-1,j+1} - CH_{i-1,j}) \quad (23)$$

Después, desarrollamos la expresión que permite calcular  $\mu$  para instantes en el tiempo  $i \geq 2$  y las posiciones de inspección en el radio  $1 < j < nr$  a partir de la ecuación diferencial (Ecuación 4). La expresión numérica se presenta en la Ecuación 10.

$$CH_{i,j} = CH_{i-1,j} + \frac{D_e\sigma r}{j} [(j+1)CH_{i-1,j+1} - 2jCH_{i-1,j} + (j-1)CH_{i-1,j-1}] \quad (24)$$

La ecuación que permite calcular  $CH$  para instantes en el tiempo  $i \geq 2$  y la posición de inspección  $j > nr$  se obtiene a partir de la transformación de la ecuación que expresa la condición de

evaporación en la superficie (Ecuación 5) y obtenemos la ecuación de diferencias finitas para calcular  $CH_{i,j}$ .

$$CH_{i,j} = CH_{i-1,j} + 2r[D_e\sigma(CH_{i-1,j-1} - CH_{i-1,j}) - (1 - \alpha)h_m\delta r(CH_{i-1,j} - CH_\infty)] \quad (25)$$

Las ecuaciones (18), (19) y (20) conforman la solución numérica del modelo de transporte de humedad de arcillas higroscópicas (MTH-AH).

*Código del Modelo de Transporte de Humedad.* El código que realiza las operaciones iterativas del sistema de ecuaciones que conforman el modelo se presenta en la Figura 9. El programa solicita 11 datos de entrada (ecuación 12) y presenta los resultados numéricos en graficas de distancia de transporte contra contenido de humedad y tiempo contra contenido de humedad. El código fue elaborado y ejecutado en el software MATLAB®.

$$E = \{D, h_m, \varepsilon, \tau, \sigma, \alpha, CH_\infty, R, nr, CH_{1,1-7}, nt, \Delta t\} \quad (26)$$

```
function [th,ri]=SphereMassTransfer_8(D,K,n,t,sigma,a,hr,daire,hsat,R,nr,th0,nt,dt)
%function [th,R]=SphereMassTransfer_8(D,h,n,t,sigma,a,hr,daire,hsat,R,nr,th0,nt,dt)
%D = input ('COEFICIENTE DE DIFUSIÓN DE AGUA EN EL AGREGADO (cm²/s):');
%K = input ('COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE MASA (cm/s):');
%n = input ('POROSIDAD DEL AGREGADO:');
%t = input ('TORTUOSIDAD DEL AGREGADO:');
%sigma = input ('FACTOR DE VISCOSIDAD DEL FLUIDO:');
%a = input ('CONSTANTE DE PERMEABILIDAD DEL AGREGADO:');
%hr = input ('HUMEDAD RELATIVA DEL AIRE CIRCUNDANTE AL AGREGADO:');
%daire = input ('DENSIDAD DEL AIRE A PRESIÓN ATMOSFERICA (g/cm³):');
%hsat = input ('CONTENIDO DE HUMEDAD DEL AIRE SATURADO (g/cm³):');
%R = input ('RADIO DEL PELLETT (cm):');
%nr = input ('NUMERO DE PUNTOS EN EL RADIO DE INSPECCIÓN:');
%th0 = input ('VECTOR HUMEDAD INICIAL DEL AGREGADO:');
%nt = input ('NUMERO DE PUNTOS EN EL TIEMPO:');
%dt = input ('INTERVALO DE TIEMPO:');
%%
th=zeros(nt,nr);
dr=R/(nr-1);
ri=linspace(0,R,nr);
threal=(hr*hsat)/100;
tha=(threal/daire)*100;
De=D*n*t;
for j=1:nr;
    th(1,j)= th0(j);
end
for i=2:nt;
    for j=1:nr;
        if j==1;
            th(i,j)=th(i-1,j)+(((6*dt)/(dr*dr))*((De*sigma))*(th(i-1,j+1)-th(i-1,j))));
        elseif (j>1)&&(j<nr);
            th(i,j)=th(i-1,j)+((De*sigma)/j)*(dt/(dr*dr))*(((j+1)*th(i-1,j+1)-(2*j*th(i-1,j))+((j-1)*th(i-1,j-1))));
        elseif j==nr;
            th(i,j)=th(i-1,j)+(2*(dt/(dr*dr))*((De*sigma)*(th(i-1,j-1)-th(i-1,j)))-
(K*a*dr*((th(i-1,j)-tha)))));
        end
    end
end
end
```

Figura 9. Código fuente de la programación de las ecuaciones en MATLAB®.

Se utilizaron las propiedades macroestructurales de la TD mencionados en la sección de Materiales y Métodos. El factor de viscosidad  $\sigma$  fue 1 y el factor de recubrimiento  $\alpha$  de 0, 96% HR, Propiedades del aire saturado a 25°C y presión atmosférica de 1 atm. El coeficiente de transferencia de agua promedio fue  $\hat{h}_m = 3.75 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , . Se determinó el radio  $R$  de 0.5 cm, basado en la geometría de los pellets de TD elaborados para realizar los experimentos de desecación. Los puntos de inspección en el radio  $nr$  fueron 7. Los periodos de tiempo designados para evaluar el transporte de humedad, fueron: número de intervalos en el tiempo  $nt$  de 279936000 (corresponde a 9 días), intervalo de tiempo  $\Delta t$  de 0.0027778 s.

*Verificación del modelo.* La distribución del contenido de humedad para los 7 puntos equidistantes en dirección radial se calculó usando las ecuaciones 2 y 3, basado en proporción de los componentes utilizados para elaborar los pellets usados en los experimentos de desecación (dosis de 200  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada y 0.20 g de TD), el contenido de humedad  $CH_G = 20\%$  y se supuso que el contenido de humedad inicial en el centro del agregado es  $CH_0 = 20\%$ . Por lo que  $m$  es igual a 0. La función de distribución inicial (cuando  $i = 1$ ) del contenido de humedad queda como  $CH(r) = 20$ . Los valores en cada uno de los 7 puntos de inspección ( $j = 1 - 7$ ) fueron los que se muestra a continuación en la Ecuación 13.

$$(CH_{1,1-7}) = [20,20,20,20,20,20,20] \quad (27)$$

La Figura 10 presenta los valores obtenidos por el modelo del contenido de humedad del pellet en función del radio  $r$  para un periodo de 9 días. En general, el contenido de humedad disminuye progresivamente con el tiempo en cada uno de los 7 puntos de inspección. En particular, la superficie del pellet (donde  $R = 0.5 \text{ cm}$ ) en contacto con el aire circundante equilibra su contenido de humedad en las etapas tempranas del proceso de desecación, por lo que se puede observar que el contenido de humedad disminuye hasta  $\sim 10\%$  después de las primeras 24 horas.

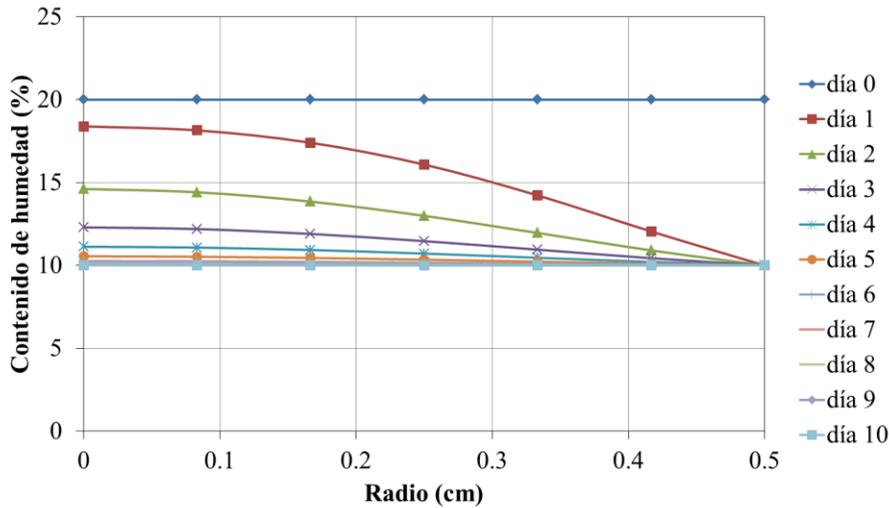


Figura 10. Pronostico de la distribución espacial del contenido de humedad en el pellet en un periodo de 10 días, a 23 °C y 96% HR.

La Figura 11 muestra la evolución del contenido de humedad en cada uno de los siete puntos de inspección en un periodo de 9 días. Se observa una clara tendencia hacia la reducción del contenido de humedad hasta alcanzar el equilibrio en cada uno de los puntos de inspección, aproximadamente en 10%.

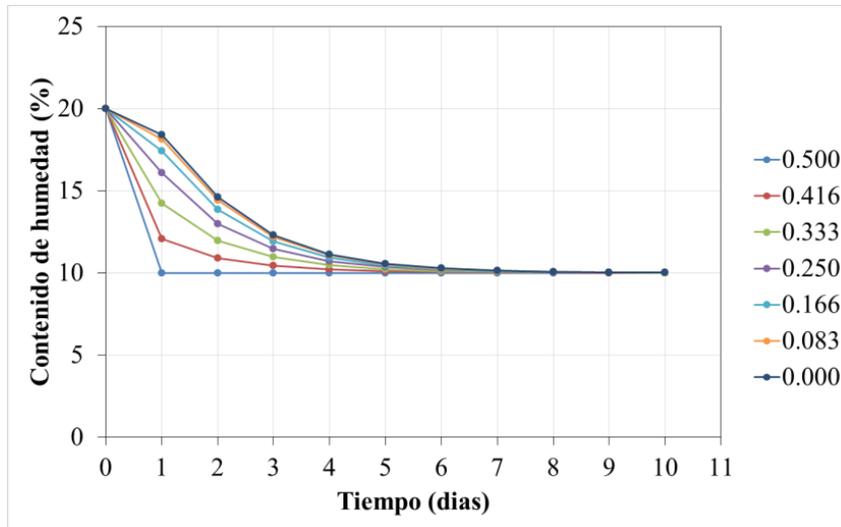


Figura 11. Pronostico de la evolución de contenido de humedad en cada uno de los 7 puntos de inspección del pellet, a 23 °C y 96% HR.

El valor del coeficiente de difusión  $D$  fue determinado por dos procedimientos: 1) después de repetidas simulaciones numéricas con el modelo (Ecuaciones 23, 24 y 25) de manera que se obtuvo que  $D$  sea  $4.747 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $\eta = 0.5$ ,  $\tau = 0.9$ ,  $\sigma = 1$  y  $\alpha = 0.4$ . El  $RMSE$  entre los valores de los

datos de la curva experimental y los datos de la curva numérica fue de 15 y 2) después de repetidas simulaciones numéricas con el modelo temporal de transferencia de masa (Ecuación 21) de manera que se obtuvo que el valor diario de  $D$  va de  $1.562 \times 10^{-8}$  a  $1.875 \times 10^{-2} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$  y el  $RMSE$  entre los datos experimentales y los datos pronosticados fue de 2.17.

En la Figura 12 se muestra el comportamiento temporal de los valores de contenido de humedad del pellet obtenidos experimentalmente y pronosticado con el modelo. La curva de datos numéricos describe el comportamiento estándar en forma de una J girada 90°, esta curva muestra como el contenido de humedad disminuye rápidamente en los primeros dos días, en cambio, el comportamiento de los datos experimentales muestra que el contenido de humedad disminuye en forma casi lineal los primeros dos días, después de los cuales desciende más rápidamente. La curva de los datos experimentales alcanza un  $CH_{\infty}$  de 30%, la curva de datos numéricos alcanza el  $CH_{\infty}$  de 25%.

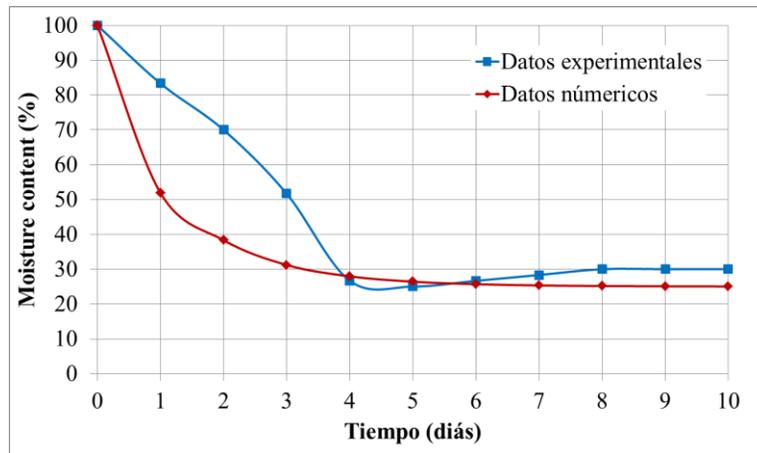


Figura 12. Cinéticas de contenido de humedad en pellets de TD, experimental y pronosticado por el modelo MTH-AH.  $D$  constante, temperatura de 23 °C y humedad relativa de 96%.

*Simulación del efecto de la porosidad del pellet.* La Figura 13 presenta el comportamiento del contenido de humedad en función de la porosidad  $\eta$  del pellet (0.9, 0.7, 0.5, 0.3 y 0.1). Se observa que al reducirse  $\eta$ , la tasa de transferencia de humedad del pellet decrece. En relación a los resultados reportados por Matadamas-Ortiz et al. (2014), que mezcla diferentes materiales para elaborar pellets con NEP, explica que su efecto en el tiempo de supervivencia está relacionado con la variación de la forma de las partículas de arcilla y la distribución de su tamaño. Además, la compactación del granulo por la rodadura en el proceso mecánico de pelletización influye en las características y propiedades de la estructura del pellet como el cambio de la relación entre el

material sólido, canales, capilares y poros, lo que afecta a la pérdida de humedad y el tiempo de supervivencia de los NEP.

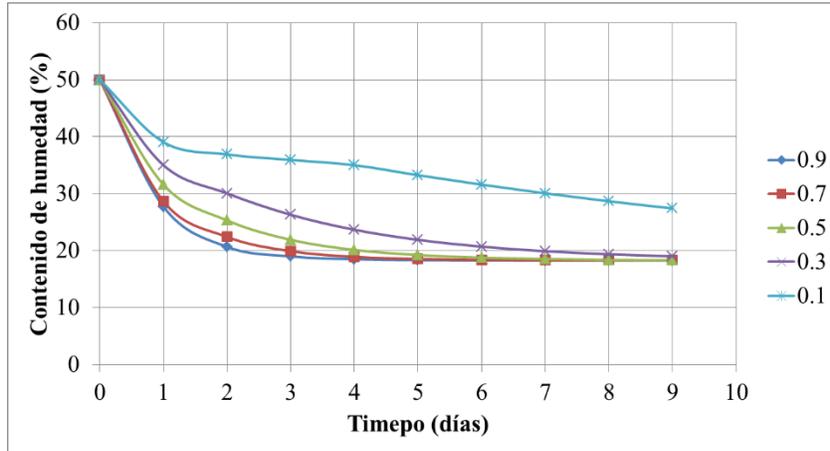


Figura 13. Pronóstico de la evolución del contenido de humedad por efecto de la porosidad del pellet a 23 °C y 96% HR.

*Simulación del efecto de la viscosidad de la fase líquida del pellet.* La Figura 14 presenta el pronóstico del comportamiento del contenido de humedad del pellet por el aumento de la viscosidad de la fase líquida. Matadamas-Ortiz et al. (2014) señala que los agentes naturales gelificantes adicionados a la fase líquida del pellet facilitan la adhesión de partículas de agua alrededor de los NEP, manteniendo el contenido de humedad de su cutícula.

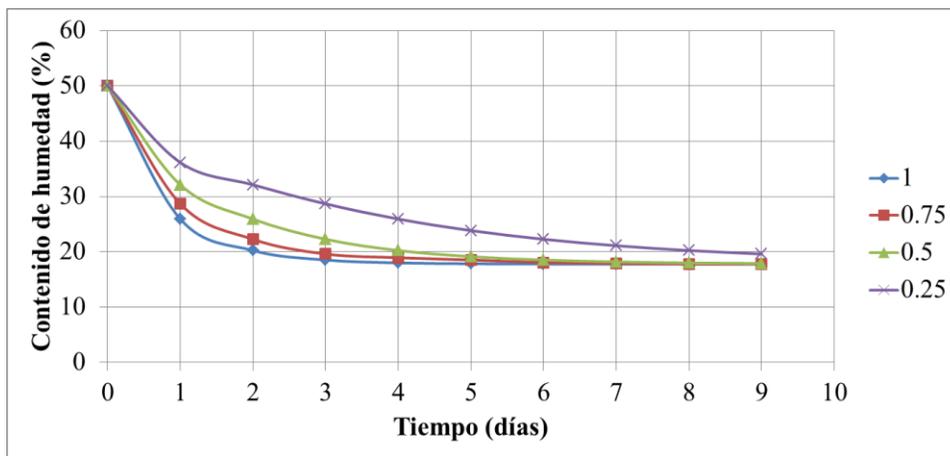


Figura 14. Evolución del contenido de humedad por efecto del incremento de la viscosidad de la fase líquida del pellet a 23 °C y 96% HR.

La "fluidez" o la "movilidad"  $\alpha$  es un factor que toma en cuenta el aumento de la viscosidad del agua adyacente a las superficies minerales de arcilla en relación a la del agua a granel y tiende a reducir la tasa de transporte difusivo de solutos en el suelo (Shackelford et al. 2013).

*Simulación del efecto del recubrimiento superficial del pellet.* En la Figura 15 se presenta el comportamiento del contenido de humedad en función del grado de recubrimiento de la superficie del pellet (0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0). La permeabilidad es la capacidad que tiene un material de permitirle a un flujo que lo atraviese sin alterar su estructura interna. Matadamas-Ortiz et al. (2014) aplico una capa de aceites vegetales sobre el pellet para formar una capa sobre las partículas y poros con objeto de obstruir el flujo de humedad hacia el aire circundante, es decir, impermeabilizar la superficie por medio del recubrimiento.

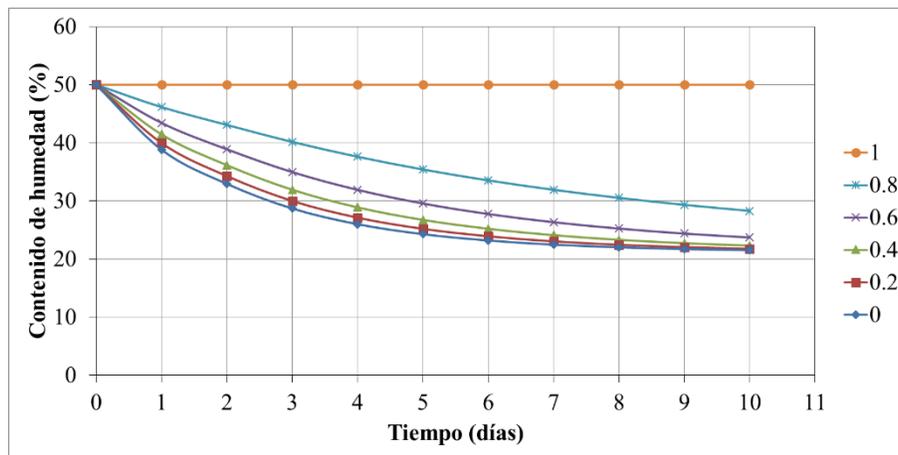


Figura 15. Evolución del contenido de humedad por efecto del recubrimiento a temperatura de 23°C y humedad relativa de 96%.

Paau (1998) menciona la utilidad de los compuestos de recubrimiento para obstruir el movimiento de agua en los gránulos. Por ello, los gránulos se recubren con compuestos solubles en agua, tales como sacarosa, gelatina, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa y polietilenglicol. De la misma manera, el uso de recubrimiento en el empaquetado de productos alimenticios ayuda a controlar la transferencia de humedad de los alimentos con la atmosfera circundante, al actuar como barreras contra el flujo de la humedad (Janjarasskul, & Krochta, 2010).

### 3.3.2. Discusión

El análisis de los datos de pérdida de peso del granulo reportados por Grewal (2000) muestra que la tasa de pérdida de contenido de humedad promedio fue de 0.0714 % dia<sup>-1</sup>. Patel et al. (1997a)

reportan que el contenido de humedad del nematodo *S. glaseri* (NC strain) de 1130  $\mu\text{m}$  de longitud y 43  $\mu\text{m}$  de ancho está entre 70-73% y señalan que esta especie tolera mucho menores contenidos de agua durante el secado lento comparado con el secado rápido. Por tanto, procesos de desecación con tasas de pérdida de humedad del orden de 17  $\mu\text{g}/\text{h}$  no son adecuados para inducir al nematodo *S. glaseri* a un estado de anhidrobiosis en pellets de TD.

El modelo de simulación de la transferencia de humedad en arcillas higroscópicas (MTH-AH) permite la estimación espacial y temporal del comportamiento estándar del contenido de humedad en pellets formados por la cohesión entre las partículas a granel, el modelo facilita la predicción de los resultados y la comparación entre experimentos bajo diferentes condiciones antes de hacerlos.

Sin embargo, el modelo hace varios supuestos simplificadores que podrían estar relajados. El primer supuesto es la cohesión entre las partículas a granel. Un posible mejoramiento podría ser representar la heterogeneidad en la estructura porosa del agregado por efecto de la compactación mecánica, lo que generaría variación en el coeficiente de difusión efectiva de humedad y la tasa a la cual el contenido de humedad del pellet se pierde. Derivado de esto, el segundo supuesto es una distribución uniforme del contenido de humedad en el pellet.

Un tercer supuesto del modelo es que el movimiento de la humedad al interior del pellet depende de la difusión. La teoría sugiere que la migración interna del agua en un cuerpo poroso también puede suceder por capilaridad, aunque en menor medida. De manera que la dirección de flujo de humedad puede variar negativamente o positivamente.

El cuarto supuesto del modelo es que el fenómeno es libre de reacciones químicas. Por ahora, la limitada información disponible sobre la naturaleza química de las excreciones de los NEP y su reacción con los ingredientes de la formulación, apoya su independencia con el flujo de humedad, pero experimentos de desecación de pellets con NEP y el análisis químico de los componentes de las excreciones pueden ser necesarios para rechazar o afirmar esta hipótesis. De cualquier manera hemos conservado los supuestos simplificadores anteriores, ya que por ahora los datos disponibles parecen insuficientes para distinguir de forma fiable entre sus efectos.

Las ecuaciones para predecir el movimiento de la humedad están basadas en el flujo interno de humedad por gradientes de contenido de humedad y la transferencia de humedad por diferencias en la concentración de humedad entre la superficie del pellet y el aire circundante bajo condiciones ideales (sin fuentes de variación). Siete factores operan en el modelo MTH-AH para reducir la

pérdida de humedad del pellet. La transferencia de humedad es función de factores de reducción como: el coeficiente de difusión de agua  $D$  toma en consideración propiedades macroscópicas como la porosidad  $\eta$ , tortuosidad  $\tau$  para estimar el coeficiente de difusión efectivo  $D_e$ .

El CH y su razón de pérdida deben ser parámetros de control de la calidad para el mejoramiento de la estabilidad de almacenamiento de las formulaciones comerciales bajo condiciones de temperatura y humedad relativa variables, como señalan Grewal and Peters (2005) y Perry et al. (2012). Porque el incremento de la tasa de pérdida de agua es crítico para el nematodo *S. glaseri*, el cual está biológicamente adaptado para inducir los cambios bioquímicos y moleculares necesarios para estabilizar su cutícula y reemplazar el agua perdida por trehalosa (como un mecanismo para la supervivencia en estado parcial de anhidrobiosis) bajo procesos de desecación a baja tasa de pérdida de agua (Patel et al. 1997a,b; Patel & Wright, 1998; Wharton, 2002).

La pérdida de agua del cuerpo del NEP se explica por qué la contracción celular causada por la pérdida inicial de agua del cuerpo del NEP provoca la pérdida de contacto entre las membranas celulares y las paredes celulares de la cutícula del NEP, lo cual incrementa la permeabilidad de su cutícula y la tasa de pérdida de agua, principalmente en los espacios intercelulares (Freckman et al. 1977; Rastogi et al. 2005). De manera que la transferencia de humedad del NEP sucede porque el agua del NEP se difunde a través de su cutícula por un proceso de desecación osmótica, el agua se difunde a través de la estructura hacia la capa externa del pellet y después se transfiere por evaporación desde la superficie hacia el aire circundante. Por tanto, *S. glaseri* posee mejores aptitudes para superar un proceso de desecación a menores tasas de pérdida de humedad.

Este modelo ayudara a hacer predicciones sobre el comportamiento del contenido de humedad y la tasa de pérdida de contenido de humedad del pellet para evaluar las características estructurales y condiciones de almacenamiento bajo las cuales se alcanza el contenido de humedad óptimo o el tiempo de secado adecuado, además de proporcionar información para analizar la interrelación entre las propiedades macroscópicas y microscópicas de estas estructuras porosas y el movimiento de la fase líquida contenida en ellas. Esta herramienta de modelación podría ser eventualmente incorporada al método convencional de desarrollo de formulaciones con NEP en arcillas higroscópicas, como una herramienta útil para el estudio de la transferencia de humedad de los pellets de arcillas higroscópicas en la etapa de diseño de reservorios microestructurados para NEP, permitiendo optimizar la formulación granular para la aplicación de nematodos sobre el suelo agrícola.

# CAPÍTULO 4 Evaluación de la pérdida de humedad del pellet con un adyuvante mejorador de la viscosidad y evaluación de la infectividad de juveniles infectivos envejecidos sobre *P. vetula*

## 4.1. Adición de extracto de nopal en la fase líquida y su efecto en la pérdida de humedad de pellets de TD

El objetivo de este experimento fue evaluar adición de un agente gelificante natural a la fase líquida del pellet y su efecto en la retención de humedad. La pregunta de investigación es: ¿Cómo la adición de un agente gelificante al pellet de TD natural afecta su disponibilidad de humedad? La hipótesis de trabajo es: Si el mucilago de nopal es un agente natural gelificante que retiene agua y se adiciona a la fase líquida del pellet, entonces, la concentración de mucilago en la fase líquida aumenta la retención de agua en el pellet.

### 4.1.2. Resultados

La Figura 16 presenta las curvas de viscosidad típicas contra velocidad de cizallamiento para dispersiones de extracto líquido de los cladodios de nopal *Opuntia ficus indica* a diferentes concentraciones (w/v) y a 25°C. Se puede ver que al aumentar la concentración de extracto líquido de nopal en la fase líquida su viscosidad incrementa.

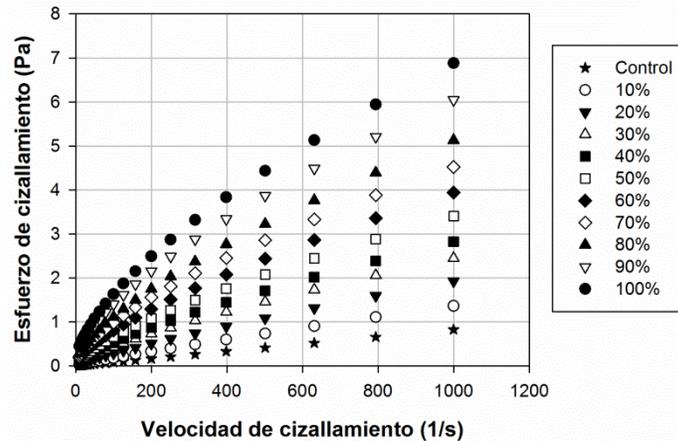


Figura 16. Curvas de viscosidad para las suspensiones con agua bidestilada y concentraciones del extracto de nopal (*Opuntia ficus indica*) propuestas, a 25 °C.

El comportamiento del contenido de humedad de los pellets elaborados con TD y fase líquida de agua bidestilada con distintas concentraciones del extracto de nopal (*Opuntia ficus indica*) se presenta en la Figura 17. La presentación de las curvas se restringe a un periodo de 10 días porque

fue en ese día que el contenido de humedad de dejó de descender, entonces tenemos el contenido de humedad de equilibrio. Se puede ver que las curvas exhiben la misma tendencia en su comportamiento.

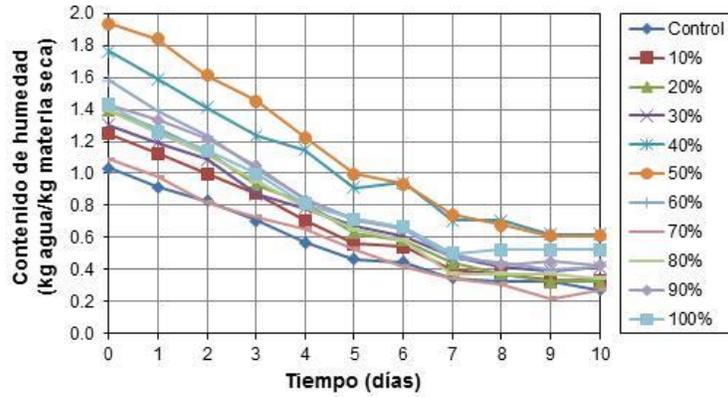


Figura 17. Evolución del contenido de humedad en pellets elaborados con TD y agua bidestilada con distintas concentraciones de extracto de nopal (*Opuntia ficus indica*) y almacenados a  $23 \pm 3^\circ\text{C}$  y 96-100% HR.

El mayor contenido de humedad inicial y menor contenido de humedad de equilibrio en pellets de TD por la adición de extracto líquido de nopal se observan después de un periodo de 10 días de almacenamiento a  $23 \pm 3^\circ\text{C}$  y 96-100% HR (Figura 18). De 0 a 50% de concentración de extracto de nopal en la fase líquida se observa que incrementa el contenido de humedad inicial y de equilibrio en el pellet. Con más del 50% el comportamiento de ambos parámetros es decreciente. La concentración de 50% favorece en mayor medida la retención de humedad en el pellet.

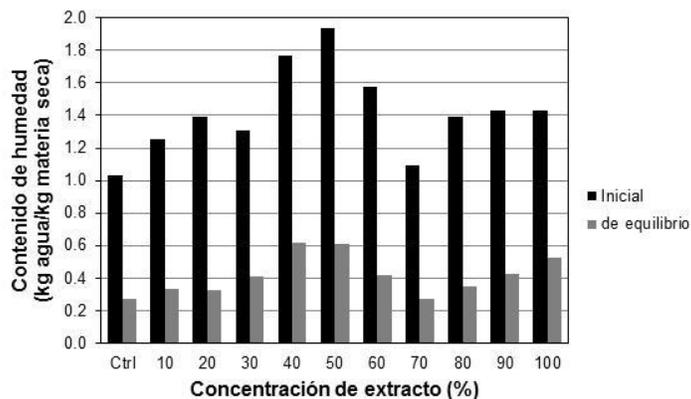


Figura 18. Contenido de humedad inicial y de equilibrio de pellets elaborados con TD y agua bidestilada con distintas concentraciones de extracto de nopal (*Opuntia ficus indica*) y almacenados a  $23 \pm 3^\circ\text{C}$  y 96-100% HR.

#### 4.1.2. Discusión

El incremento de la concentración de mucilago en la fase líquida aumenta la retención de agua en el pellet en relación al tratamiento de control. En el intervalo de 0 a 50% la relación es incremental, sin embargo, después la relación es decreciente. Matadamas-Ortiz et al. (2014) alude que la viscosidad de los agentes naturales gelificantes facilitan la adhesión de partículas de agua alrededor de los NEP, manteniendo el contenido de humedad de su cutícula. En este sentido, la literatura señala que la "fluidez" o la "movilidad"  $\alpha$  es un factor que toma en cuenta el aumento de la viscosidad del agua adyacente a las superficies minerales de arcilla en relación a la del agua a granel y tiende a reducir el tasa de transporte difusivo de solutos en el suelo (Shackelford et al. 2013).

#### **4.2. Envejecimiento de *S. glaseri* y su efecto en la infectividad sobre *P. vetula***

El objetivo de este experimento fue investigar el envejecimiento de *S. glaseri* y su efecto en la infectividad sobre larvas de gallina ciega *P. vetula*. La pregunta de investigación es: ¿Cómo el envejecimiento de los JI afecta su infectividad sobre *P. vetula*? La hipótesis es que el envejecimiento de los JI no tiene un efecto en la infectividad sobre *P. vetula* y la hipótesis nula es que si hay un efecto. Este conocimiento es útil para optimizar el método de reproducción y obtener JI más infectivos para pelletizarlos mecánicamente en TD.

##### 4.2.1. Resultados

La tasa de penetración y máxima mortalidad de *P. vetula* fue observada después del tratamiento con JI de 1 a 7 días de envejecimiento. La tasa de penetración de *S. glaseri* se encuentra en un rango de 1.55 a 11.06%, el valor máximo se presentó cuando el envejecimiento de los JI aplicados fue de 7 días, mientras que pocos nematodos penetraron cuando JI de 1 día envejecimiento fueron aplicados. Los resultados del análisis estadístico confirman que la correlación más significativa se presenta entre el envejecimiento y la tasa de penetración ( $r = 0.854$ ,  $P = 0.0143$ ) e indica que ambas incrementan juntas.

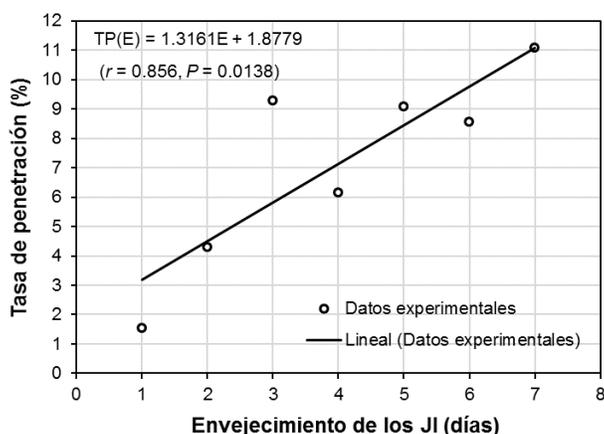


Figura 19. Comportamiento de la tasa de penetración de *S. glaseri* en *P. vetula* en relación a la edad de los JI.

La mortalidad de *P. vetula* se encuentra en un rango de 30 a 80%, pero no aumento significativamente con el envejecimiento de los JI. La mortalidad máxima se presentó cuando JI de 6 días fueron aplicados, mientras que el valor mínimo ocurrió cuando el envejecimiento de los JI fue de 7 días. El porcentaje de mortalidad de *P. vetula* ascendió pero no en forma constante durante el periodo evaluado. El porcentaje de mortalidad cuando los JI son cosechados en el sexto día interrumpió la tendencia general. Usando un modelo lineal, no existió relación significativa entre el envejecimiento (E) y la mortalidad de *P. vetula* (M) ( $r = 0.0429$ ,  $P = 0.927$ ) o entre la tasa de penetración (TP) y la M ( $r = 0.154$ ,  $P = 0.741$ ). Por un procedimiento de ajuste de la tendencia de los datos se encontró que E vs M y TP vs M siguen a una curva polinómica de segundo orden (Figuras 20 y 21). Donde ambos factores crecen juntos y luego uno de ellos se mantiene constante o desciende.

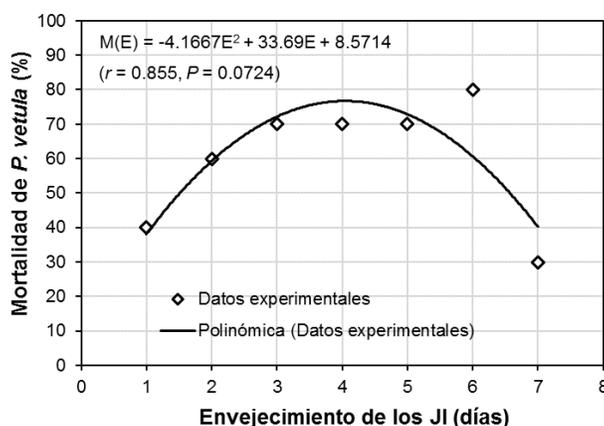


Figura 20. Mortalidad de las larvas de *P. vetula* por el enfrentamiento con JI envejecidos.

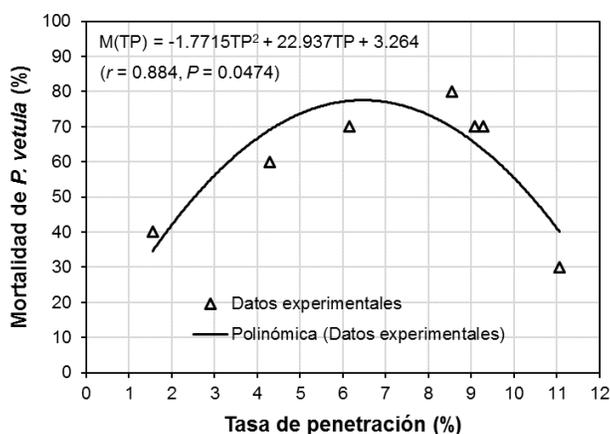


Figura 21. Mortalidad de las larvas de *P. vetula* y tasa de penetración de los JI envejecidos.

#### 4.2.2. Discusión

Stock and Goodrich-Blair (2014) sugieren que en *S. glaseri*, "pre-JI" son la forma que sale del cadáver y si estos juveniles migran en un medio totalmente líquido, no se desarrollan por completo a la forma de JI, lo que implica que su principal característica, la infectividad puede estar disminuida comparada con un JI. Lo que observamos cuando enfrentamos JI contra *P. vetula*, fue baja mortalidad del insecto en los primeros dos días de envejecimiento de los nematodos. Contra *G. mellonella* la tasa de penetración de *S. glaseri* es elevada (Caroli et al. 1996).

Kim et al. (2014) opinan que la capacidad infectiva de los JI puede disminuir rápidamente con el tiempo porque no se alimentan hasta que encuentran un nuevo huésped y para mantenerse activos utilizan la reserva de lípidos de sus cuerpos y el gasto energético aumenta si la temperatura supera los 15°C (Koppenhofer & Kaya, 2002). Esta precedente no es conocido en *S. glaseri*, pero en estudios con el nematodo *H. megidis*, los JI que emergieron pronto mostraron buena habilidad de búsqueda del hospedero y una mayor tolerancia a la temperatura, pero se dispersaron poco y tuvieron poca tolerancia a la desecación. Mientras que los JI que emergieron tarde mostraron poca habilidad de búsqueda del hospedero inicial y pobre tolerancia a la temperatura pero se dispersaron bien y poseen mayor tolerancia a la desecación (O'leary et al. 1998) y los juveniles *S. arenarium* cosechados en el décimo día de la captura fueron más patógenos sobre *G. mellonella* que los cosechados en el tercer día de la captura (Han et al. 2012).

Koppenhöfer et al. (2004) evaluaron la susceptibilidad de las larvas de tercer instar de las gallinas ciegas *P. crinita*, *P. congrua* y *P. georgiana* a los nematodos *S. glaseri*, *H. bacteriophora* y *S.*

*scarabei* contra, en dosis de 400 JI por insecto. De las especies usadas, *S. glaseri* fue la que causo el menor porcentaje de mortalidad en las larvas de gallina ciega.

En opinión de Shapiro and Glazer (1996), Koppenhöfer et al. (1997), Shapiro and Lewis (1999), Lewis et al. (2002) y Perez et al. (2003) la suspensión de JI en agua bidestilada después de la emergencia del hospedero puede causar estrés y afectar su supervivencia e infectividad. Ellos sugieren que los JI que emergen del hospedero y se dirigen hacia el suelo tienen mayor tasa de supervivencia, de dispersión y de infectividad que los JI almacenados en agua bidestilada después de emerger de cadáveres colocados en trampa White.

## CAPÍTULO 5 Evaluación de pellets de TD con nematodos *S. glaseri*

### 5.1. La rápida pérdida de humedad del pellet y su efecto en la supervivencia e infectividad de los JI

El objetivo fue investigar la migración de la humedad de los pellets de TD almacenados a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  y 96-100% HR y su efecto en la supervivencia e infectividad de los nematodos *S. glaseri*. Este conocimiento es útil para responder a la pregunta: ¿Cómo la pérdida de humedad del pellet afecta la estabilidad de almacenamiento de *S. glaseri*? La hipótesis es que si *S. glaseri* es una nematodo de estrategia de deshidratación lenta y la disponibilidad de humedad de la TD depende de HR de la atmósfera circundante, la baja supervivencia e infectividad de *S. glaseri* en pellets de TD es causada por la pérdida rápida de humedad del pellet. De manera que se espera conocer el umbral de mortalidad del nematodo debido a la rápida pérdida de humedad en esta formulación.

#### 5.1.1. Resultados

El contenido de humedad inicial promedio de los pellets fue de 66% y la tasa de pérdida de humedad fue de 4.24% por día. La Figura 22 muestra la evolución del contenido promedio de humedad de los pellets durante los 10 días que duró la evaluación de la supervivencia de los JI. El tiempo requerido para desecar el pellet hasta el contenido de humedad de equilibrio fue de 8 días.

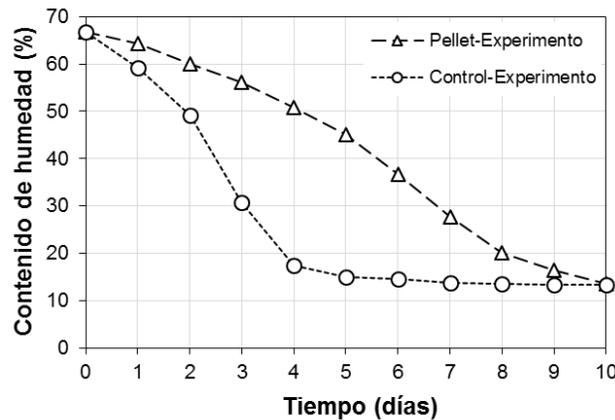


Figura 22. Evolución del contenido de humedad de los pellets con y sin nematodos *S. glaseri*, almacenados a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  y 96-100% HR.

La supervivencia de *S. glaseri* en el pellet de TD se redujo lentamente, pero después de 8 días de almacenamiento de los pellets a 96-100% HR, la disminuyó repentinamente 0.871 a 0.4 (Figura 23). El tiempo medio de supervivencia fue 8.83 días.

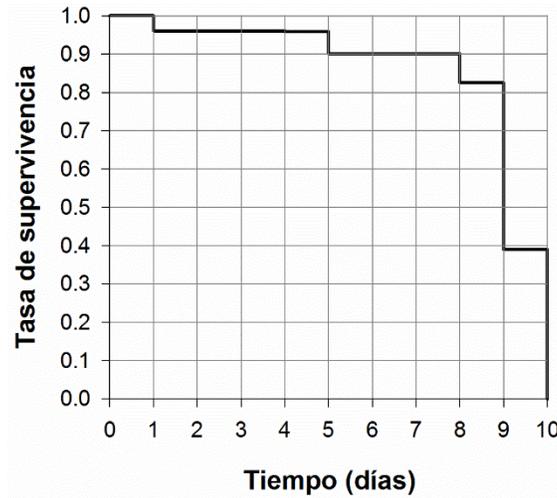


Figura 23. Tasa de supervivencia del *S. glaseri* en pellets de tierra diatomea, a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  y 96-100% HR.

El mayor porcentaje de mortalidad de *G. mellonella* por el enfrentamiento con los JI se observa en un periodo de 10 días (Figura 24). En los primeros 4 días la infectividad se mantuvo constante, después comenzó a decaer linealmente y a partir del día 8 disminuyó significativamente.

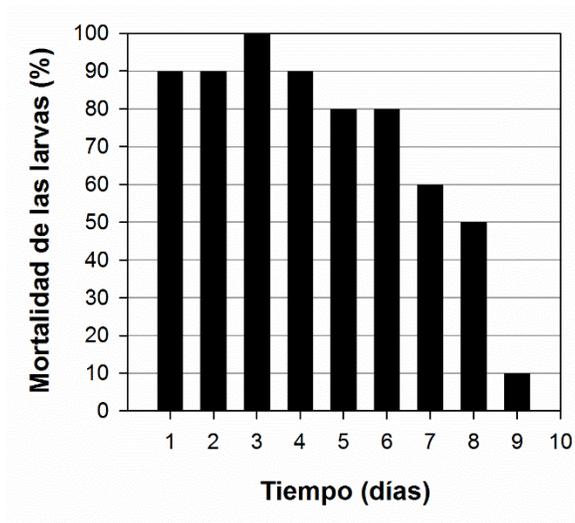


Figura 24. Infectividad de juveniles *S. glaseri* pelletizados en TD sobre larvas de *G. mellonella* en un periodo de 10 días a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### 5.1.2. Discusión

Según los datos de la cinética de secado se puede observar que la rápida pérdida del contenido de humedad del pellet de TD incrementa la mortalidad del nematodo *S. glaseri*. Bajo condiciones de

almacenamiento con mayor variabilidad de la temperatura y HR este efecto de la pérdida de humedad del pellet sobre la supervivencia es más evidente.

Matadamas-Ortiz et al. (2014) encapsularon JI de la especie *S. glaseri* en pellets de TD (Celite<sup>®</sup> 209) por medio de flujo vertical de arcillas higroscópicas en tolvas convergentes. Los pellets se almacenaron a una temperatura ambiente de  $23 \pm 6^{\circ}\text{C}$  y humedad relativa de 50-85% en envases cilíndricos de poliestireno (60 mm de diámetro, 87 mm de altura y área de la sección transversal de  $2827 \text{ mm}^2$ ) con broche de presión en las tapas de polietileno. El tiempo de supervivencia se evaluó en pellets con diferentes niveles de exposición al aire ambiente (ventilación) y reportó 1 y 6.3 días promedio de supervivencia para los recipientes abiertos y cerrados, respectivamente.

Por lo tanto, la retención de humedad en los pellets de TD es un factor determinante, primero para mantener JI viables y luego para conseguir una alta mortalidad en larvas de *G. mellonella*. El contenido de humedad inicial de los juveniles de *S. glaseri* (raza NJ-43) utilizados en este estudio fue de 73%, lo cual es consistente con lo reportado por Demeure and Freckman (1981) y Patel et al. (1997a).

## **5.2. Preaclimatación de los JI pelletizados y su efecto en la supervivencia y la infectividad sobre *P. vetula***

El propósito de este experimento fue probar la preaclimatación de los JI antes de ser pelletizados en TD y su efecto en el tiempo de supervivencia y la infectividad sobre larvas de gallina ciega (*Phyllophaga vetula*). La pregunta de investigación es: ¿Cómo la preaclimatación de JI antes de la pelletización en TD afecta su supervivencia e infectividad sobre *P. vetula*? La hipótesis nula es que la supervivencia y la infectividad de los JI recogidos de cajas de Petri con yeso de Paris se conservan iguales que la supervivencia y la infectividad de JI colectados de trampa White contra la hipótesis alternativa de que el tiempo de supervivencia y la infectividad de JI recogidos de TW son diferentes que el tiempo de supervivencia y la infectividad de JI de YP. El diseño experimental fue de parcelas divididas. Los factores de las parcelas fueron los tratamientos TW y YP dispuestos en un diseño completamente al azar.

### **5.2.1. Resultados**

La Figura 25 presenta el comportamiento temporal del contenido de humedad de los pellets de TD con JI colectados de TW o YP y un Control (pellet de TD sin JI). El contenido de humedad inicial

del pellet con juveniles del tratamiento TW fue 47%, mientras que en el pellet con JI recogidos de YP fue 50%.

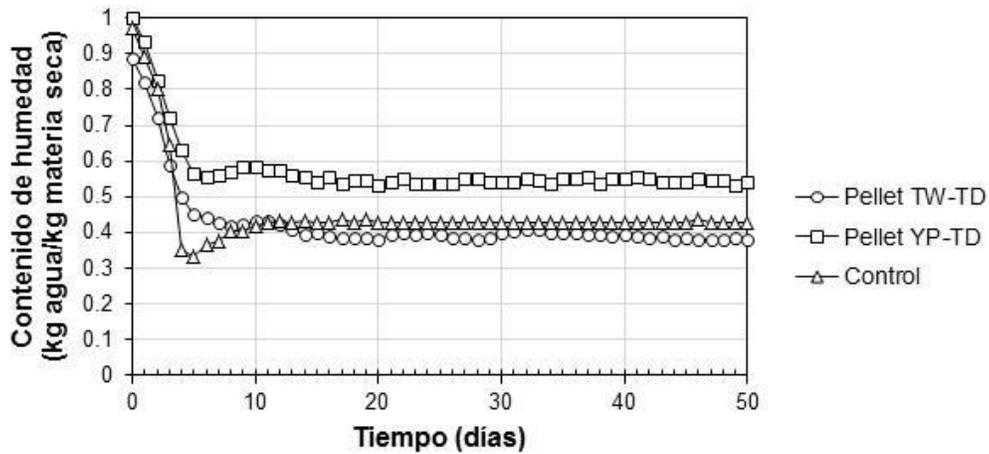


Figura 25. Comportamiento temporal del contenido de humedad en pellets de TD con JI colectados de TW o YP. El almacenamiento fue a 21-26°C y 96-100% HR.

La Figura 26a muestra una fotografía de la aglomeración de JI sobre los cadáveres en la caja Petri con yeso de Paris. En contraposición a la trampa White, donde los JI que emergieron de los cadáveres se dispersaron en el papel filtro humedecido y se movieron en dirección a la película de agua (Figura 26b). La Figura 27 muestra la tasa de supervivencia de los JI colectados de YP o TW en pellets de TD o AB.

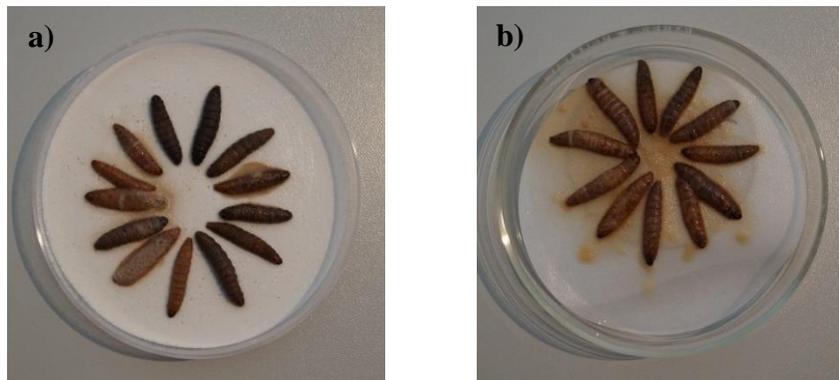


Figura 26. JI emergiendo de hospederos infectados colocados sobre: a) yeso Paris y b) trampa White.

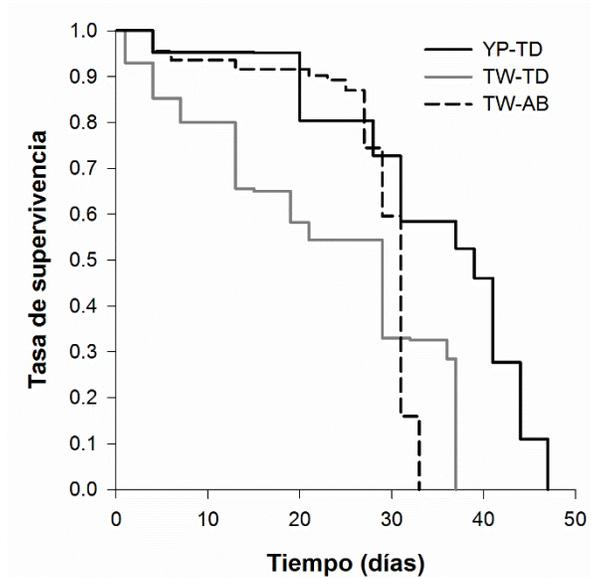


Figura 27. Supervivencia de *S. glaseri* mecánicamente pelletizado en TD o concentrados en AB. YP: colectados de yeso Paris y TW: colectados de trampa White.

Se observó mejor supervivencia de los nematodos de YP-TD, mientras que más pobre fue la supervivencia de los nematodos de TW-TD. El tiempo medio de supervivencia (TMS) de los JI de TW-AB fue de 28.1 días y su intervalo de confianza al 95% es de 27.7 y 28.5 días. El TMS de TW-TD fue de 23.15 días y el TMS de YP-TD fue de 34.49 días, lo que significa un incremento de ~50% respecto del TMS de los juveniles de TW-TD. El tiempo de supervivencia del 50% de los JI de los tratamientos YP-TD y TW-TD fue de 39 y 29 días, respectivamente.

Las diferencias en el tiempo de supervivencia fueron estadísticamente significantes ( $\chi^2 = 590$  y Log-Rank  $< 0,001$ ). Por lo tanto, la primera premisa se cumple porque el uso de JI colectados de YP para la formulación mecánica en TD aumenta significativamente el tiempo de supervivencia en comparación con el uso de JI colectados de TW.

La Figura 28 muestra una gráfica de los porcentajes de mortalidad de las larvas de *P. vetula* conseguidos como resultado de su exposición a los JI de los tratamientos TW-AB, YP-TD y TW-TD, en un periodo de 50 días. El 10% del total de las larvas inoculadas con JI del tratamiento TW-AB fueron infectadas. El 2% del total de las larvas inoculadas con JI del tratamiento YP-TD fueron infectadas, mientras que por el lado de los JI colectados de hospederos del tratamiento TW-TD solo 1.2% de las larvas fueron infectadas.

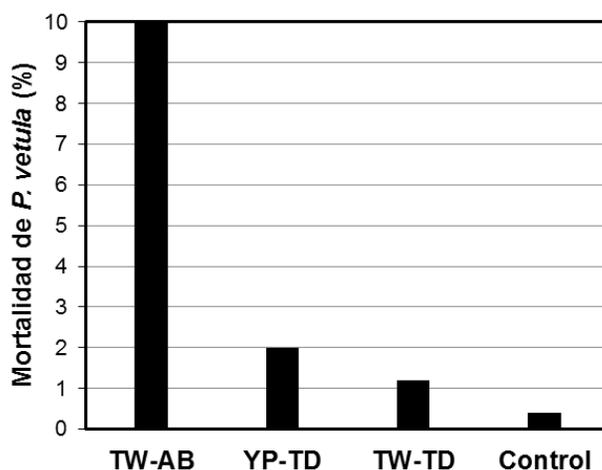


Figura 28. Mortalidad de *P. vetula* por el enfrentamiento con JI cosechados de los tratamientos TW o YP, depositados en AB o pelletizados en TD y el Control.

Las diferencias en la mortalidad de *P. vetula* por los tratamientos y respecto al Control muestran que TW-AB fue el único con una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) respecto al Control. Respecto al tratamiento de pelletización TW-TD también se presenta una diferencia significativa con TW-AB ( $P < 0.05$ ). Por lo tanto, la segunda premisa no se cumple porque el uso de JI colectados de YP para la formulación mecánica en TD no aumenta significativamente su infectividad en comparación con el uso de JI colectados de TW. A primera vista este último análisis sugiere un efecto negativo de la pelletización en TD en el porcentaje de infectividad de *S. glaseri* sobre *P. vetula*.

### 5.2.2. Discusión

La Tabla 3 presenta las formulaciones que se han elaborado con el nematodo *S. glaseri* y se puede ver que la supervivencia de NC-43 está en el rango de tiempo de vida de nuestros experimentos con NJ-43. En la literatura son escasos los estudios que reportan la formulación de esta especie, esto se explica porque no es el modelo más comúnmente usado para estudios de formulación.

Respecto a la supervivencia, nuestros hallazgos proveen evidencia de que el uso de JI colectados de yeso Paris tiene un efecto significativo en el tiempo de supervivencia de *Steinernema glaseri* encapsulados mecánicamente en pellets de TD. De manera que la principal contribución es el mejoramiento del tiempo de supervivencia logrado por Matadamas-Ortiz et al. (2014), quienes usaron JI colectados de trampa White tres días después del inicio la emergencia del cadáver del insecto para la pelletización en TD.

Tabla 3. Formulaciones con *S. glaseri*, método de crianza, condiciones de almacenamiento y tiempo de supervivencia.

Crianza	Formulación	Almacenamiento		Tiempo de supervivencia (meses)	Fuente
		°C	HR		
NC 34, in vivo or in vitro	atapulgita	28		0.933	Bedding (1991)
NJ43	Wettable powder	22-25	-	0.03-0.06	Grewal and Peters (2005)
3 días de nacido, trampa White	Tierra diatomea	23±6	0-85	0.470	Matadamas-Ortiz et al. (2014)
NJ43, 3 días de nacido, trampa White	Tierra diatomea	21-26	96-100	0.966	Este estudio
NJ43, 3 días de nacido, yeso París	Tierra diatomea	21-26	96-100	1.300	Este estudio

Las condiciones de almacenamiento de los pellets de TD fue otro factor que ayudo a mejorar la supervivencia de *S. glaseri*. Mientras que Matadamas-Ortiz et al. (2014) almacenó los pellets a  $23 \pm 6^{\circ}\text{C}$  y 50-85% HR, en este estudio se usó una solución de sulfato de potasio para reducir la variación de la humedad relativa, logrando mantenerla en 96-100% a  $21-26^{\circ}\text{C}$ , lo que ayudó a mantener el nivel de actividad de agua, oxígeno y humedad adecuado para los nematodos en estado de metabolismo reducido (Georgis & Kaya, 1998), porque el cambio en el contenido de humedad de los materiales desecantes en forma de polvos expuestos al ambiente depende de su contenido de humedad inicial y de la HR de la atmosfera circundante (Callahan et al. 1982).

En la etapa de cultivo de JI se les observó aglomerándose gradualmente sobre los cadáveres colocados sobre el yeso de Paris humedecido conforme emergían. Silver et al. (1995) explica que a medida que los nematodos se reproducen en el cuerpo de una larva infectada, el número de nematodos dentro del cadáver aumenta hasta que virtualmente todo lo que queda es una masa de juveniles agregados situada en el centro de una envoltura que la circunda. En las condiciones naturales del suelo, este paquete puede desecarse parcialmente a medida que pierde gradualmente humedad con el medioambiente pero sobreviven mediante la reducción de su tasa de metabolismo o permaneciendo dentro del cadáver hasta que la condición de humedad mejora (Kaya & Koppenhöfer, 2004).

El comportamiento de agregación de los JI ha sido observado en *S. glaseri* en respuesta a las condiciones ambientales adversas como sequía, para evitar la desecación. Sin embargo, Womersley et al. (1998) y Shapiro-Ilan et al. (2014) señalan que los nematodos tienen una propensión natural a

la agregación en ausencia de estímulos internos o externos y puede que no sea una respuesta directa a la deshidratación y se cree que se presenta más en dispersión y migración (McSorley, 2003).

En la etapa de desagregación del pellet por rehidratación para la recuperación de la movilidad de los NEP se observó que la proporción de JI de los tratamientos TW-TD y YP-TD que se encontraban enrollados fue en aumento, estimamos que en la primer semana del experimento fue 10% y en la última semana fue 60%. Este comportamiento de los JI hizo necesario incrementar gradualmente el tiempo de incubación después de la rehidratación de 15 minutos en la primera semana hasta 18 horas en la última para aumentar el número de JI con movilidad.

La idea generalizada es que el enrollamiento de los individuos sirve para reducir el área de superficie expuesta a la desecación y ralentizar la velocidad de secado. Pero, en opinión de Grewal et al. (2006), el enrollamiento no se ha observado consistentemente durante la desecación de nematodos entomopatógenos y no se correlaciona con la supervivencia.

Por lo que se observó en este experimento la aptitud de *S. glaseri* para soportar el proceso de desecación en pellets de TD, fueron más sobresalientes cuando los JI se colectaron de yeso Paris. Estos resultados concuerdan con las observaciones de Pérez et al. (2003), quienes sugieren que los JI que emergen directamente de los cadáveres al suelo tienen mayor supervivencia. Para fines de formular NEP en pellets, la concentración de JI en una masa de material higroscópico, facilita la adaptación natural de los nematodos a condiciones de bajo contenido de humedad para inducir el estado parcial de anhidrobiosis, que es necesario para sobrevivir a la desecación en TD.

Respecto a la infectividad, en esta investigación la mortalidad de *P. vetula* conseguida por el enfrentamiento con *S. glaseri* en pellets de TD fue mediocre. Enseguida se discuten algunos posibles factores que pudieron influir negativamente en la infectividad de *S. glaseri* contra *P. vetula*.

En nuestros bioensayos de infectividad la especie predominante fue *P. vetula* seguido de *P. lennis*. Sin embargo, las larvas fueron asignadas al azar antes de ponerlas en el bioensayo y la mezcla de poblaciones de diferentes especies de Scarabeidos no es un factor influyente el porcentaje de control, porque en enfrentamientos del nematodo *S. glaseri* (Steiner) contra *P. crinita*, *P. congrua* logro un control  $\leq 23\%$  y contra *P. georgiana* fue de 6% (Koppenhöfer et al. 2004).

Otra posible explicación de este resultado puede ser que los JI no estaban suficientemente desarrollados. En el caso de *S. glaseri*, la forma pre-JI es la que emerge del cadáver, finaliza su

desarrollo en el sustrato de yeso y después migra hacia el agua (Poinar Jr, 1979). Pero tal vez tres días de espera para coleccionar los juveniles después del inicio de la emergencia del cadáver de *G. mellonella* puede ser un tiempo insuficiente para lograr el completo desarrollo del pre-JI.

Es un hecho probado que la formulación de JI en gránulos dispersables en agua induce el estado parcial de anhidrobiosis y aumenta su longevidad y, que la infectividad de estos JI contra *G. mellonella* es alta, aunque también es bien conocido que esta es una larva altamente susceptible a la infección por nematodos (Grewal, 2000; Grewal & Jagdale, 2003). Además, aunque en la literatura existe información sobre el desempeño de los JI contra *Phyllophaga* spp. en bioensayos con suelo; que es su hábitat natural; no hay información que explique lo que sucede con la movilidad de los JI formulados en gránulos dispersables en agua o pellets de TD y su infectividad contra el insecto-plaga después que son recuperados por rehidratación. El estudio más reciente de Girón-Pablo et al. (2015) reportó 75% de mortalidad de las larvas de *P. vetula* usando una dosis letal de 1000 JI de *S. glaseri* aplicados en AB y un 10% de mortalidad con la misma especie formulada en pellets de bentonita, bajo condiciones de laboratorio.

Hipotéticamente, la movilidad de los JI supervivientes fue bien recuperada por medio de la rehidratación del pellet pero tal vez el porcentaje de JI que fueron aptos para penetrar e infectar fue insuficiente para matar a *P. vetula*, porque no se consideraron las condiciones o el tiempo suficientes para recuperar por completo de su estado de metabolismo reducido al mayor número de JI supervivientes antes de ponerlos en la arena de ensayo.

## **CAPÍTULO 6 Especificaciones de diseño para el desarrollo de un formulado con nematodos *S. glaseri***

Además del aseguramiento de la efectividad de un NEP para matar un insecto plaga en el laboratorio, el desempeño del formulado para almacenar, transportar y aplicar los JI es otro factor clave para conseguir el control efectivo del insecto en el campo de cultivo, porque el formulado se ocupa de aumentar la estabilidad de almacenamiento y proteger a los JI, facilitar su aplicación y potenciar su actividad patógena. El proceso de formulación para el desarrollo de un formulado con NEP involucra las etapas de reproducción de los JI, elaboración del formulado y evaluación.

En etapas previas de este estudio se formularon JI de *S. glaseri* en pellets de TD y se consiguió aumentar su tiempo de supervivencia, sin embargo, su infectividad sobre *P. vetula* fue insuficiente para controlar al insecto en laboratorio. Por esta razón, se emprendió la modificación del diseño existente para conseguir uno de mejor desempeño. En este capítulo se presenta el diseño conceptual de un reservorio para nematodos *S. glaseri* como agente de control biológico de *P. vetula* que fue elaborado siguiendo el método descrito en la subsección 0de los Materiales y Métodos.

### **6.1. Resultados**

#### **6.1.1. Declaración de necesidad**

La declaración de necesidad es: modificar la formulación existente para conseguir una de mejor desempeño para extender el tiempo de supervivencia de *S. glaseri* a temperatura ambiente y lograr el control efectivo de larvas de *P. vetula* en pruebas de laboratorio; como una etapa de aseguramiento de la calidad antes de la prueba en campo.

#### **6.1.2. Análisis de mercado**

Sobre la necesidad planteada, la información recopilada en patentes, publicaciones científicas, catálogos de proveedores y fabricantes no revelo una solución de diseño disponible o producto que aporte la solución requerida para formular a los nematodos *S. glaseri* de manera que se pueda extender su tiempo de supervivencia a temperatura ambiente y mantener su infectividad para controlar efectivamente a las larvas de *P. vetula*.

#### **6.1.3. Requerimientos de diseño**

Las entrevistas (Anexo 1) a los usuarios involucrados en la elaboración y uso del formulado muestran que un usuario declaró que participa en las tres etapas del proceso como investigador, uno participa en la RJI como investigador, uno en la EF como investigador y el cuarto en la RJI como laboratorista. 25 requerimientos que los usuarios esperan en el nuevo diseño fueron recogidos en las entrevistas. En la Tabla 4 se presentan los requerimientos agrupados por etapas del proceso de formulación.

Tabla 4. Lista de requerimientos agrupados por etapas del proceso de formulación

<b>Etapas</b>	<b>Requerimiento</b>
Reproducción de JI	Sencillo
	Barato
	de alta producción de JI por hora-hombre invertidas
	que prepare a los JI para la formulación
	que preserve la patogenicidad de los JI
	que mejore la infectividad contra el insecto plaga
Formulación	Proteger a los JI de los factores bióticos
	Aumentar el tiempo de supervivencia de los JI
	Mantener la infectividad de los JI
	Para almacenaje a temperatura y HR ambientales
	Resistencia al manejo durante el almacenaje y transporte
	Contener JI en alta concentración
	Producirse masivamente
	Preservar la viabilidad de los JI
	Evitar la desecación de los JI
	Suministrar nutrientes solamente para mantenimiento
	Fácil de elaborar
	Fácil de empacar y desempacar
	Sin variación significativa de su funcionalidad a temperatura ambiente
Evaluación de la formulación	Cause alta mortalidad de la plaga
	Aumente el contacto con la plaga
	Aumente la interacción con la plaga
	Fácil de usar
	Producto de características uniformes
	Alta viabilidad de los JI
	Alta infectividad contra la plaga
	Soluble en agua

	Fácil de aplicar
	Virulencia > 60%

#### 6.1.4. Ponderación de la importancia de los requerimientos de diseño

La calificación de importancia asignada por cada uno de los cuatro usuarios fue una medida absoluta que fue de 1 (menos importante) a 10 (más importante) para cada requerimiento individual y luego se obtuvo el promedio (Anexo 2). La lista ordenada de los requerimientos se agrupo en conjuntos por etapas del proceso de formulación se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Lista de requerimientos de diseño priorizados.

<b>Etapas</b>	<b>Requerimiento</b>	<b>Importancia</b>	<b>Obligatorio/Deseado</b>
Reproducción de JI	Sencillo	8	D
	Barato	7	D
	de alta producción de JI por hora-hombre invertidas	9	D
	que prepare a los JI para la formulación	8	D
	que preserve la patogenicidad de los JI	9	D
	que mejore la infectividad contra el insecto plaga	10	O
Formulación	Proteger a los JI de los factores bióticos	8	D
	Aumentar el tiempo de supervivencia de los JI	10	O
	Mantener la infectividad de los JI	10	O
	Para almacenaje a temperatura y HR ambientales	9	D
	Resistencia al manejo durante el almacenaje y transporte	9	D
	Contener JI en alta concentración	8	D
	Producirse masivamente	8	D
	Preservar la viabilidad de los JI	9	D
	Evitar la desecación de los JI	9	D
	Suministrar nutrientes solamente para mantenimiento	7	D
	Fácil de elaborar	9	D
	Fácil de empacar y desempacar	9	D
	Sin variación significativa a temperatura ambiente	9	D
Evaluación de la formulación	Cause alta mortalidad de la plaga	10	O
	Aumente el contacto con la plaga	9	D
	Aumente la interacción con la plaga	9	D
	Fácil de usar	9	D
	Producto de características uniformes	9	D
	Alta viabilidad de los JI	10	O

Alta infectividad contra la plaga	10	O
Soluble en agua	9	D
Fácil de aplicar	9	D
Virulencia > 60%	9	D

### 6.1.5. Árbol de Objetivos

Los requerimientos de diseño fueron agrupados en 5 objetivos de diseño y dos sub-objetivos (eficacia y efectividad). Las relaciones jerárquicas entre objetivos se muestran en la Figura 29. No se encontraron interconexiones entre objetivos. Se puede ver que las metas que se persiguen en este nuevo diseño son: sobre la eficacia, aumentar la capacidad de producir los efectos deseados para mantener la viabilidad y patogenicidad de los JI de *S. glaseri* es en las etapas de RJI y FB y sobre la efectividad, que el formulado logre alta mortalidad de *P. vetula* en la etapa de evaluación.

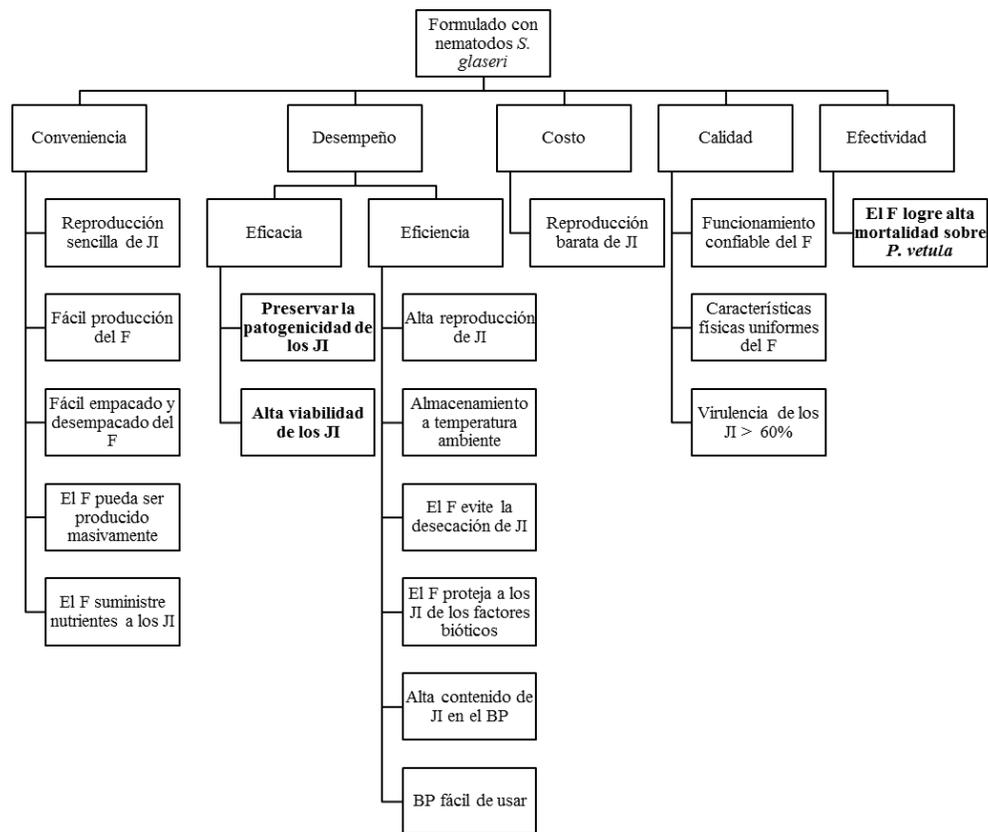


Figura 29. Árbol de objetivos de una formulación para *S. glaseri*. JI: juveniles infectivos, F: formulado.

### 6.1.6. Diagrama de la función general

Los materiales inertes y entes vivientes, sustancias, información de procedimientos y accesorios son las entradas para cumplir la función general de mantener JI viables y patógenos por largo tiempo y la salida es el formulado con *S. glaseri* (Figura 30). A partir de este paso se comienza a desarrollar el concepto de formulado para mantener JI viables y patógenos por largo tiempo.

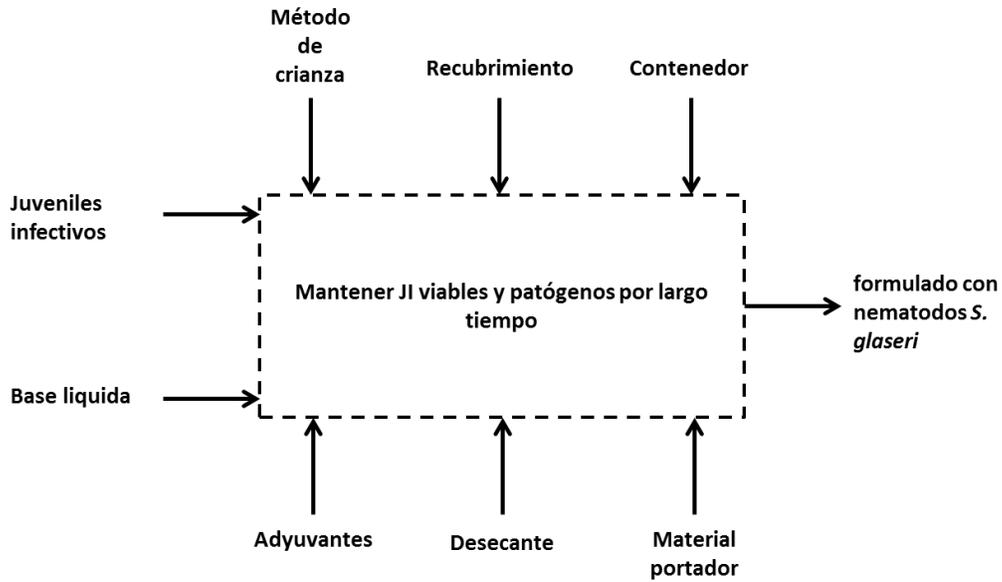


Figura 30. Diagrama de la función general del formulado con nematodos *S. glaseri*.

### 6.1.7. Árbol de funciones

Las sub-funciones organizadas en una secuencia sistemática y lógica para permitir la ejecución de las acciones individuales que se necesitan para realizar la función principal se muestran en la Figura 31.

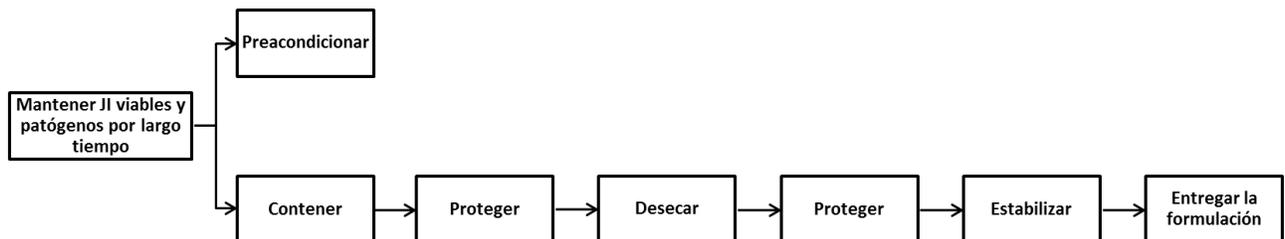


Figura 31. Árbol de funciones para un formulado con nematodos *S. glaseri*.

### 6.1.8. Estructura funcional

Seis sub-funciones principales deben llevarse a cabo eficazmente para producir un formulado que mantenga viables y patógenos a los JI por largo tiempo (Figura 32). Las sub-funciones están vinculadas a las características de los JI y los materiales que conforman el formulado.

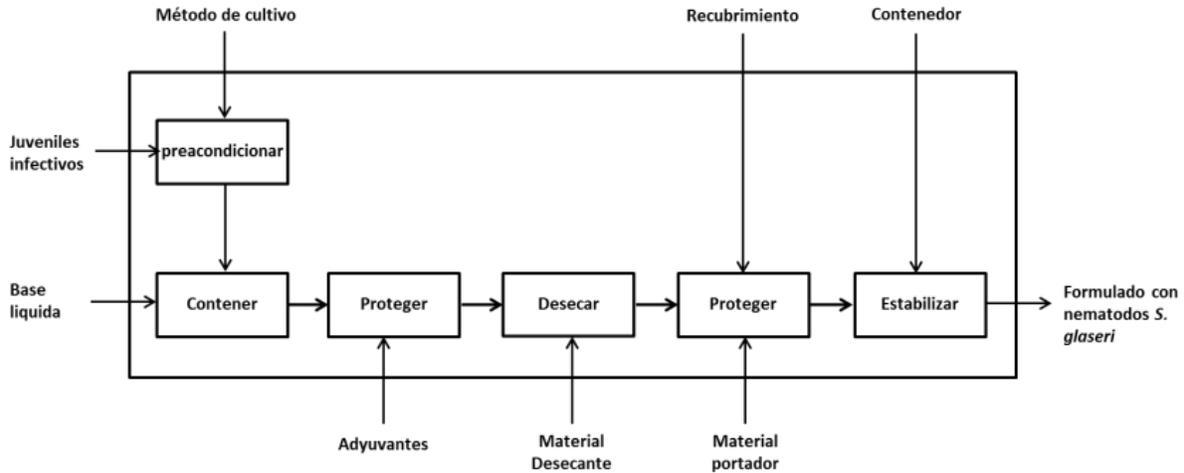


Figura 32. Estructura funcional de la formulación de *S. glaseri*.

#### 6.1.9. Especificaciones de ingeniería

Según el análisis de la declaración de necesidad “Modificar la formulación existente para conseguir una de mejor desempeño para extender el tiempo de supervivencia de *S. glaseri* a temperatura ambiente y lograr el control efectivo de larvas de *P. vetula* en pruebas de laboratorio” y el árbol de objetivos (Figura 29), el nivel de generalidad de la solución demandada obliga al diseñador a considerar únicamente el mejoramiento de las funciones del formulado tipo pellets.

En la casa de calidad de la Figura 33, los requerimientos obligatorios y deseados son colocados con las especificaciones de desempeño. En cada etapa del proceso de formulación de *S. glaseri* los requerimientos obligatorios aparecen en color rojo. Las especificaciones de ingeniería con la mayor importancia relativa para satisfacer la necesidad propuesta fueron:

1. Aumentar el tiempo de supervivencia  $\geq 3$  meses
2. Mantener la tasa de supervivencia de los JI  $\geq 0.9$
3. Aumentar el porcentaje de infectividad sobre el insecto plaga  $\geq 90\%$
4. Reducir el tiempo para causar la muerte de *P. vetula* a  $\leq 4$  días

		Especificaciones de ingeniería																																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28					
Requisitos	Reproducción de JI	que mejore su infectividad contra el insecto plaga	10																															
		que preserve su patogenicidad	9																															
		de alta producción por hora-hombre invertidas	9																															
		que lo prepare para la formulación	8																															
		sencillo	8																															
		barato	7																															
		Formulado	aumentar el tiempo de supervivencia de los JI	10	9	9																												
	mantener la infectividad de los JI		10			9	9	9																										
	para almacenaje bajo condiciones ambientales		9			9	9	9																										
	resistencia al manejo durante el almacenaje y transporte		9								9	9																						
	preservar la viabilidad de los JI		9	9	9			9	9	9																								
	evitar la desecación de los JI		9	9								9	9																					
	fácil de elaborar		9																															
	fácil de empacar y desempacar		9																															
	sin variación significativa a temperatura ambiente		9	9	9	9	9	9																										
	características uniformes		9																															
	proteger a los JI de los factores bióticos		8	9	9																													
	contener JI en alta concentración		8						9	9	3																							
	producirse masivamente		8																															
	suministrar nutrientes para mantenimiento	7	9	9																														
	Evaluación del formulado	cause alta mortalidad de la plaga	10			9																												
		alta viabilidad de los JI	10	9	9																													
		aumente el contacto con la plaga	9																															
		aumente la interacción con la plaga	9																															
		fácil de usar	9																															
		vinulencia > 60%	9																															
		Importancia absoluta		558	639	504	333	333	191	243	180	203	171	324	252	147	237	129	228	264	207	93	181	165	177	252	360	378	324	252	633	192	216	252
	Importancia relativa		10	11	9	5	5	3	4	3	3	3	5	4	2	4	2	4	4	4	3	1	3	2	3	4	6	5	4	11	3	3	4	1

Figura 33. Casa de calidad del formulado con *S. glaseri*.

## 6.2. Discusión

Las especificaciones de ingeniería para el diseño del pellet son parámetros para clarificar de manera cuantitativa las funciones del formulado. De manera que su cumplimiento le otorgara los siguientes atributos distintivos al formulado en relación al diseño anterior del pellet de TD: confiabilidad, usabilidad, producible industrialmente y barato.

Sin embargo, el análisis de las especificaciones con la casa de calidad muestra que el grupo de especificaciones de mayor importancia presenta una fuerte correlación con los requerimientos obligatorios establecidos por los usuarios y revela que los usuarios demandan mayor confiabilidad del pellet en el cumplimiento de sus funciones.

Los requerimientos que se refieren a la facilidad de reproducción de JI, elaboración, empacado, desempacado y aplicación del formulado son interpretados como indicadores de usabilidad y sus especificaciones de ingeniería son la facilidad con la que las operaciones son llevadas a cabo en cada etapa del proceso de formulación de *S. glaseri* y también su cantidad.

Una formulación tipo pellet es producible industrialmente si está diseñada de forma tal que se pueda fabricar una masiva cantidad de réplicas mediante el uso de maquinaria y tecnología en cada etapa del proceso. Para producir 36000 pellets/h es necesario simplificar las operaciones y minimizar su número para llevar a cabo el proceso biotecnológico que satisfaga esta demanda de producción.

Los usuarios demandan como último atributo del pellet, que la reproducción de JI, elaboración del pellet y uso se realicen al costo más bajo. Para ello, el pellet debe ser diseñado de tal forma que se elabore usando materiales simples que estén disponibles en la región, tecnología simple y reducida cantidad de horas-hombre para realizar las labores de laboratorio. Sin impactar negativamente en la calidad del pellet.

Los factores a considerar para el desarrollo de un formulado para nematodos *S. glaseri* se muestra en la Figura 34. Este diagrama muestra que si la estructura del pellet cumple nuevas funciones adicionales, entonces puede ser convertido en un reservorio microestructurado, que es la forma óptima de asegurar la supervivencia e infectividad de los JI.

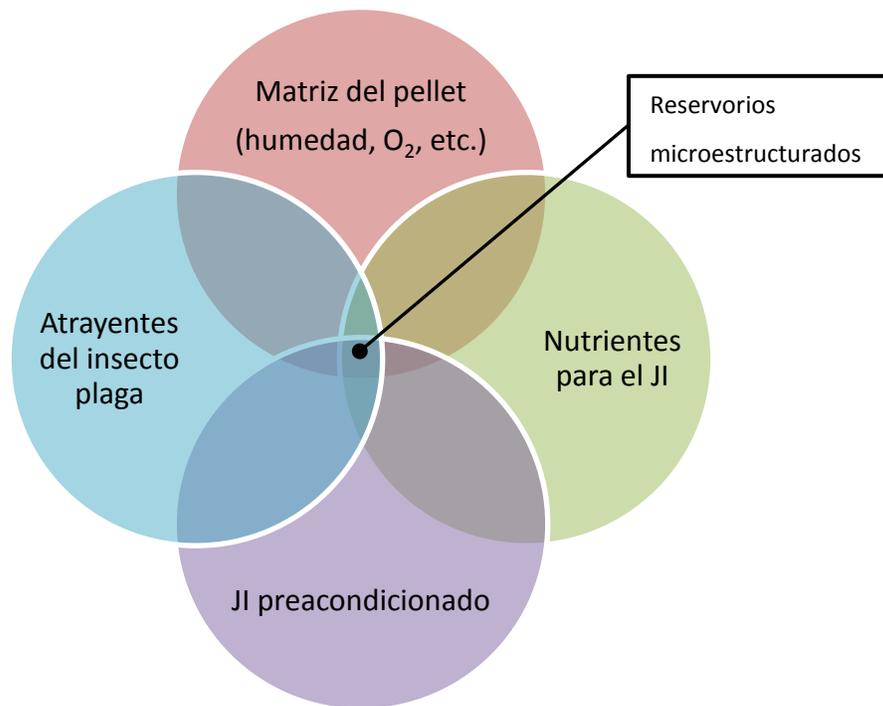


Figura 34. Esferas de influencia que representan consideraciones para el diseño de reservorios microestructurados para nematodos *S. glaseri*.

## CONCLUSIONES

La retención de la humedad en el pellet de TD es un factor básico para mejorar el tiempo de supervivencia y la infectividad de *S. glaseri*, porqué el 52% de la variación en la tasa de supervivencia de *S. glaseri* y el 61% de la infectividad sobre *G. mellonella* se explican por la pérdida del contenido de humedad del pellet. En tanto que el 83% de la variación en la infectividad sobre *G. mellonella* se explica por el porcentaje de JI supervivientes. Además, el pellet debe poder retener al menos 27% de contenido de humedad para evitar la muerte repentina de los JI.

Respecto al transporte de humedad en el pellet de TD, la migración de humedad (MH) es bien reproducida por las teorías de difusión y evaporación superficial de humedad. En la segunda modelación, MH es muy bien reproducida con las teorías de difusión molecular y convección de humedad. Esta última teoría explica que la difusión interna de humedad sucede por gradientes de contenido de humedad dentro del pellet y el movimiento de humedad por convección debido a diferencias en la concentración de humedad entre la superficie del pellet y la atmosfera circundante.

Respecto al envejecimiento de *S. glaseri*, el tiempo de permanencia de los JI en el agua de la trampa White después de la emergencia, no tuvo efecto significativo en el porcentaje de mortalidad de *P. vetula*, excepto entre los días 6 y 7. En cuanto a la penetración, las diferencias significativas fueron entre los días de envejecimiento 1 y 4, 1 y 6 y, 1 y 7. La mayor mortalidad de *P. vetula* con *S. glaseri* se obtuvo aplicando  $1000 \pm 50$  JI de 3 a 5 días de envejecimiento por larva.

Sobre el preacondicionamiento de JI para la pelletización en TD, la supervivencia de los JI que emergieron sobre yeso de Paris fue mayor que la de los que lo hicieron en trampa White, pero los primeros fueron mediocrementemente infectivos sobre *P. vetula* y los segundos muy poco infectivos. La contribución principal de este estudio es el mejoramiento del tiempo medio de supervivencia de *S. glaseri* en pellets de TD logrado por Matadamas-Ortiz et al. (2014).

Los requerimientos de los usuarios fueron traducidos a especificaciones de ingeniería para el diseño del pellet con nematodos *S. glaseri* y su cumplimiento persigue los siguientes atributos distintivos en el formulado en relación al diseño anterior del pellet de TD: primero, confiabilidad en el desempeño del formulado; segundo, facilidad de uso; tercero, que sea reproducible industrialmente; cuarto, de bajo costo.

## RECOMENDACIONES

En relación al pellet, el contenido de humedad inicial y final y su razón de pérdida deben ser parámetros de control de la calidad para el mejoramiento de la estabilidad de almacenamiento de *S. glaseri* cuando son almacenados bajo condiciones de temperatura y humedad relativa variables, como recomiendan Grewal and Peters (2005) y Perry et al. (2012).

Respecto al modelo matemático, determinar experimentalmente algunos factores internos y externos de variación del transporte de humedad del pellet y su efecto en la pérdida de humedad e implementar nuevos supuestos modeladores en el planteamiento de las ecuaciones de transporte de humedad, por ejemplo: condiciones de humedad relativa y temperatura variables, conectividad de la microestructura del pellet por el uso de materiales de distinta porosidad o tortuosidad, adición de agentes plastificantes, aglutinantes, espesantes y fenómenos físicos como fuentes de energía o reacciones químicas, efectos capilares, permeabilidad, proceso de formación del pellet, entre otros para conocer los efectos de la rapidez de flujo de humedad en la cohesión microestructural del pellet.

Sobre el NEP, se recomienda la crianza de JI colocando los cadáveres del hospedero en el yeso húmedo de Paris para pre-aclimatarlos para la desecación en pellets de TD y mejorar su tiempo de supervivencia y se sugiere evaluar el uso de JI de edades igual o mayor a 4 días TD y diseñar procedimientos para la recuperación eficaz de su movilidad e infectividad sobre *P. vetula*. Además de probar la patogenicidad de los NEP en otros estadios larvarios de *P. vetula* para determinar su susceptibilidad a los JI.

La estrategia que se propone para controlar la tasa de pérdida de humedad del pellet es hacer la caracterización química de los ingredientes y adyuvantes, la caracterización estructural del pellet en relación a sus propiedades de transporte de humedad para ponderar la selección de los materiales y cambiar el enfoque de diseño de los pellets para; además de proveer las condiciones atmosféricas para el almacenamiento y transporte a largo plazo; funcionar como un reservorio microestructurado de recursos bioquímicos para mantener JI viables y patógenicos a largo plazo. Con este enfoque de diseño se persigue la optimización de la formulación en pellets para la aplicación directa de NEP en el suelo agrícola.

## LITERATURA CITADA

- Alpert, P. (2005). The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integrative and Comparative Biology*, 45(5), 685-695.
- Andaló, V., Cavalcanti, R. S., Molina, J. P., & Moino Jr, A. (2010). Substrates for storing entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). *Scientia Agricola*, 67, 342-347.
- Antoniou, M. (1989). Arrested development in plant parasitic nematodes. In *Helminthological Abstracts. Series B, Plant Nematology* (Vol. 58, No. 1, pp. 1-19).
- Bear, J., & Cheng, A. H. D. (2010). *Modeling groundwater flow and contaminant transport*. Berlin: Springer Science & Business Media.
- Bedding, R. A. (1988). *WIPO Patent No. WO 88/08668*. Geneva, Switzerland: World Intellectual Property Organization.
- Bedding, R. A. (1991). *U.S. Patent No. 5,042,427*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Bedding, R. A., & Butler, K. L. (1994). *WIPO Patent No. WO 94/05150*. Geneva, Switzerland: World Intellectual Property Organization.
- Bedding, R. A., Clark, S. D., Lacey, M. J., & Butler, K. L. (2000). *WIPO Patent No. WO 00/18887*. Geneva, Switzerland: World Intellectual Property Organization.
- Bhowmick, S., Zhu, L., McGinnis, L., Lawitts, J., Nath, B. D., Toner, M., & Biggers, J. (2003). Desiccation tolerance of spermatozoa dried at ambient temperature: production of fetal mice. *Biology of reproduction*, 68(5), 1779-1786.
- Burger, C. A., & Shackelford, C. D. (2008). Evaluating dual porosity of pelletized diatomaceous earth using bimodal soil-water characteristic curve functions. *Canadian Geotechnical Journal*, 38(1), 53-66.
- Burges, H. D. 1998. Formulation of mycoinsecticides, pp. 131-186. *In: Formulation of Microbial Pesticides*. Burges, H. D. (ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Callahan, J. C., Cleary, G. W., Elefant, M., Kaplan, G., Kensler, T., & Nash, R. A. (1982). Equilibrium moisture content of pharmaceutical excipients. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 8(3), 355-369.

- Capinera, J. L., & Hibbard, B. E. (1987). Bait formulations of chemical and microbial insecticides for suppression of crop-feeding grasshoppers. *Journal of Agricultural Entomology*, 4, 337-344.
- Celite Corporation (2011). Technical data [Celite 209]. Retrieved fecha.
- Charwat, S. M., Fisher, J. M., & Wyss, U. (2002). The effect of osmotic stress on desiccation survival and water content of four nematode species. *Nematology*, 4(1), 89-97.
- 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.
- Coggon, D., Harris, E. C., Poole, J., & Palme, K. T. (2003). Extended Follow-Up of a Cohort of British Chemical Workers Exposed to Formaldehyde. *Journal of the National Cancer Institute*, 95, 1608-1615.
- Connick Jr, W. J., Nickle, W. R., & Vinyard, B. J. (1993). "Pesta": New Granular Formulations for *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Nematology*, 25, 198-203.
- Connick Jr, 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, 352-359.
- Crank, J. (1975). *The Mathematics of Diffusion*; Clarendon Press: Oxford.
- Crowe, J. H., & Madin, K. A. C. (1975). Anhydrobiosis in nematodes: evaporative water loss and survival. *Journal of Experimental Zoology*, 193(3), 323-333.
- Cruz-Martínez, H. (2013). Efecto del recubrimiento del pellet en la supervivencia del nematodo *Steinernema glaseri* encapsulado mecánicamente [The effect of the coating of pellet in survival of nematode *Steinernema glaseri* mechanically encapsulated]. Unpublished Master Thesis. Instituto Politécnico Nacional: México.
- Cruz-Martínez, H., Matadamas-Ortiz, P. T., & Cortés-Martínez, C. I. (2012, Noviembre). Efecto de la pérdida de humedad del pellet en la supervivencia de nematodos *S. glaseri* encapsulados mecánicamente. Paper presented at the XXXV Congreso Nacional de Control Biológico de la Sociedad Mexicana de Control Biológico, Puebla, México.
- Demeure, Y., & Freckman, D. W. (1981). Recent advances in the study of anhydrobiotic nematodes. *Plant parasitic nematodes*, 3, 205-226.

- Derouane, E. G., Andre, J. M., & Lucas, A. A. (1988). Surface curvature effects in physisorption and catalysis by microporous solids and molecular sieves. *Journal of Catalysis*, 110(1), 58-73.
- Ehlers, R.-U. (1996). Current and Future Use of Nematodes in Biocontrol: Practice and Commercial Aspects with Regard to Regulatory Policy Issues. *Biocontrol Science and Technology*, 6, 303-316.
- Espinosa-Rodríguez, M. (2005). Diseño de una máquina para encapsular nematodos entomopatógenos [Design of a machine to encapsulate entomopathogenic nematodes] (Unpublished degree thesis). Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México.
- François, B. & Ettahiri, S. (2012). Role of the soil mineralogy on the temperature dependence of the water retention curve. In *Unsaturated Soils: Research and Applications*; Khalili, N., Russell, A., Khoshghalb, A., Eds.; Springer Science & Business media: Berlin, 173-178.
- Freckman, D. W., Kaplan, D. T., & Van Gundy, S. D. (1977). A comparison of techniques for extraction and study of anhydrobiotic nematodes from dry soils. *Journal of nematology*, 9(2), 176.
- Gaugler, R., Campbell, J. F., Selvan, S., & Lewis, E. E. (1992). Large-scale inoculative releases of the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri*: assessment 50 years later. *Biological Control*, 2(3), 181-187.
- Georgis, R. (1990). Formulation and Application Technology. In R. Gaugler & H. K. Kaya (Eds.), *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control* (pp. 173-191). Florida: CRC Press.
- Georgis, R. (1992). Present and Future Prospects for Entomopathogenic Nematode Products. *Biocontrol Science and Technology*, 2, 83-99.
- Georgis, R. (2002). The Biosys Experiment: an Insider's Perspective. In: *Entomopathogenic nematology*. R. Gaugler (ed.), CABI Publishing, Wallingford, pp. 357.
- Georgis, R., & Kaya, H. K. (1998). Formulation of entomopathogenic nematodes. In *Formulation of Microbial Biopesticides* (pp. 289-308). Springer Netherlands.
- Georgis, R., & Manweiler, S. A. (1994). Entomopathogenic nematodes: a developing biological control technology. *Agricultural Zoology Reviews*, 6, 63-94.

- Georgis, R., Dunlop, D. B., & Grewal, P. S. (1995). Formulation of entomopathogenic nematodes. In F. R. Hall & J. W. Barry (Eds.), *Biorational Pest Control Agents: Formulation and Delivery* (pp. 197-205). Washington: American Chemical Society.
- Georgis, R., Koppenhöfer, A. M., Lacey, L. A., Bélair, G., Duncan, L. W., Grewal, P. S., ... van Tol, R. W. H. M. (2006). Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. *Biological Control*, 38,103-123.
- Girón, P. S. (2008). Evaluación de dos formulaciones de nematodos entomopatógenos para el control de gallina ciega (*Phyllophaga vetula*) en maíz [Evaluation of two formulations of entomopathogenic nematodes to control white grub (*Phyllophaga vetula*) in maize] (Unpublished master's thesis). IPN CIIDIR-Oaxaca, México.
- Girón-Pablo, S., Ruiz-Vega, J., Pérez-Pacheco, R., Sánchez-García, J. A., & Aquino-Bolaños, T. (2012). Isolation of entomopathogenic nematodes and control of *Phyllophaga vetula* Horn in Oaxaca, Mexico. *African Journal of Biotechnology*, 11, 16525-16531.
- Glazer, I. (1996). Survival mechanisms of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 6(3), 373-378.
- Gornicki, K. & Kaleta, A. (2011). Some Problems Related to Mathematical Modelling of Mass Transfer Exemplified of Convection Drying of Biological Materials. In Heat and Mass Transfer-Modeling and Simulation; Hossain, M. M. Ed.; InTech: Rijeka, 143-166.
- Grewal, P. S. (1998). Formulations of Entomopathogenic Nematodes for Storage and Application. *Japanese Journal of Nematology*, 28, 68-74.
- 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 stability 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. 265-288). Wallingford, Oxfordshire, UK: CABI.
- Grewal, P. S. (2002). *WIPO Patent No. 2002047481*. Geneva, Switzerland: World Intellectual Property Organization.

- Grewal, P. S., & Georgis, R. (1999). Entomopathogenic nematodes. In F. R. Hall & J. J. Menn (Eds.), *Biopesticides: Use and Delivery* (pp. 271-299). Totowa, New Jersey: Human Press.
- Grewal, P. S., & Peters, A. (2005). Formulation and Quality. In P. S. Grewal, R. -U. Ehlers & D. I. Shapiro-Ilan (Eds.), *Nematodes as Biocontrol Agents* (pp. 79-90). Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Grewal, P. S., (2000). Enhanced ambient storage stability of an entomopathogenic nematode through anhydrobiosis. *Pest Manage. Sci.*, 56: 401–406.
- Grewal, P. S., Bornstein-Forst, S., Burnell, A. M., Glazer, I., & Jagdale, G. B. (2006). Physiological, genetic, and molecular mechanisms of chemoreception, thermobiosis, and anhydrobiosis in entomopathogenic nematodes. *Biological Control*, 38(1), 54-65.
- Grewal, P., & Georgis, R. (1999). Entomopathogenic nematodes. In *Biopesticides: Use and Delivery* (pp. 271-299). Humana Press.
- Haik, Y., Shahin, T., & Sivaloganathan, S. (2010). Engineering design process. Cengage Learning.
- Han, G. Y., Lee, D. W., Choo, Y. M., & Choo, H. Y. (2012). Effect of harvest time and infective juvenile size of the entomopathogenic nematode, *Steinernema arenarium*, on pathogenicity, development, and propagation. *Korean journal of applied entomology*, 51(1), 9-18.
- Hazir, S., Kaya, H. K., Stock, S. P., & Keskin, N. (2003). Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for Biological Control of Soil Pests. *Turkish Journal of Biology*, 27, 181-202.
- Hernández, A., Zamora, J., González, N., Salazar, E., & Sanchez, M. D. C. (2009). Anhydrobiosis quotient: a novel approach to evaluate stability in desiccated bacterial cells. *Journal of applied microbiology*, 107(2), 436-442.
- Holman, J. P. (1998). *Heat transfer*. New York: McGraw-Hill.
- Huang, Z., Banton, M. C., & Tunnacliffe, A. (2010). Modeling anhydrobiosis: activation of the mitogen-activated protein kinase ERK by dehydration in both human cells and nematodes. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 313(10), 660-670.

- Jackson, T. A. (1992). Scarabs—pests of the past or the future? [pp. 1–10]. In: Use of Pathogens in Scarab Pest Management. T. A. Jackson and T. R. Glare (eds.). Intercept Ltd., Andover, Hampshire, UK.
- Jackson, T. A., & Klein, M. G. (2006). Scarabs as pests: a continuing problem. *The Coleopterists Bulletin*, 60(sp5), 102-119.
- Jani, G. K.; Shah, D. P.; Prajapati, V. D.; Jain, V. C. Gums and mucilages: versatile excipients for pharmaceutical formulations. *Asian Journal of Pharmaceutical Science* **2009**, 4(5), 309-323.
- Kaplan, E. L. & Meier, P. (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations, *Journal of the American Statistical Association*, 53, 457-481.
- Karwe, M. V., & Deo, I. (2011). Grashof number. In Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering; Heldman, D. R. Moratu, C. I. Ed.; CRC Press: London, 717-719.
- Kaya, H. K. & Stock S. P. (1997). Techniques in insect nematology. In: Manual of Techniques in Insect Pathology. L. A. Lacey (ed) Academic Press, London. pp. 281-324.
- Kaya, H. K. M., Aguilera, M. M., Alumai, A., Choo, H. Y., de la Torre M., Fodor, A., ... Ehlers, R.-U. (2006). Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the world. *Biological Control*, 38, 134–155.
- Kaya, H. K., & Gaugler, R. (1993). Entomopathogenic nematodes, *Annual Review of Entomology*, 38, 181-206.
- Kaya, H. K., & Koppenhöfer, A. M. (2004). Biological control of insects and other invertebrates with nematodes. *Nematology: advances and perspectives*, 2, 1083-1132.
- Kaya, H. K., & Nelsen, C. E. (1985). Encapsulation of Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes with Calcium Alginate: A New Approach for Insect Control and Other Applications, *Environmental Entomology*, 14, 572-574.
- 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, 287-291.
- Kelbaliev, G. I., & Manafov, M. P. (2009). Mass transfer in the process of drying of porous materials. *Journal of Engineering Physics and Thermophysics*, 82(5), 991-999.

- Kim, J., Jaffuel, G., & Turlings, T. C. (2014). Enhanced alginate capsule properties as a formulation of entomopathogenic nematodes. *BioControl*, 1-9.
- Klein, M.G., & Georgis, R. (1994, August-September). *Application techniques for entomopathogenic nematodes*. Paper presented at the meeting of VI International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Montpellier, France.
- Koppenhöfer, A. M., & Fuzy, E. M. (2008). Attraction of four entomopathogenic nematodes to four white grub species. *Journal of invertebrate pathology*, 99(2), 227-234.
- Koppenhöfer, A. M., Baur, M. E., Stock, S. P., Choo, H. Y., Chinnasri, B., & Kaya, H. K. (1997). Survival of entomopathogenic nematodes within host cadavers in dry soil. *Applied Soil Ecology*, 6(3), 231-240.
- Kumar, S. V., Mulla, S. R., & Suresh, C. K. (2011). Isolation and molecular characterization of symbiotic bacterial isolates associated with entomopathogenic nematodes in agro climatic zone 5 of Karnataka. *Journal of Phytology*, 3, 25-29.
- Kung, S. H. & Gaugler, R. (1991). Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. *Journal of invertebrate pathology*, 57, 242-249.
- Lacey, L. A., & Georgis, R. (2012). Entomopathogenic Nematodes for Control of Insect Pests Above and Below Ground with Comments on Commercial Production. *Journal of Nematology*, 44, 218-225.
- Lacey, L. A., & Shapiro-Ilan, D. I. (2008). Microbial Control of Insect Pests in Temperate Orchard Systems: Potential for Incorporation into IPM. *Annual Review of Entomology*, 53, 121-44.
- Lacey, L. A., Shapiro-Ilan, D. I., & Glenn, G. M. (2010). Post-application of anti-desiccant agents improves efficacy of entomopathogenic nematodes in formulated host cadavers or aqueous suspension against diapausing codling moth larvae (Lepidoptera: Tortricidae). *Biocontrol Science and Technology*, 20, 909-921.
- Łaczyński, A., Dierickx, W., & De Moor, A. (2007). The Effect of Agitation System, Temperature of the Spray Liquid, Nematode Concentration, and Air Injection on the Viability of *Heterorhabditis bacteriophora*. *Biocontrol Science and Technology*, 17, 841-851.
- Lewis, E. E., Shapiro-Ilan, D. I., & McCoy, C. (2002). Development rates in entomopathogenic nematodes: infected hosts vs. aqueous suspension. *Journal of nematology*, 34(4), 340.

- Litster, J. & Ennis, B. (2004). *The Science and Engineering of Granulation Processes*; Springer Science & Business Media: Dordrecht.
- Liu, Q. Z., & Glazer, I. (2000). Desiccation survival of entomopathogenic nematodes of the genus *Heterorhabditis*. *Phytoparasitica*, 28(4), 331-340.
- Ljung, L. (1999). *System identification, Theory for the User*. Prentice Hall: New Jersey.
- Matadamas-Ortiz, P. T., Ruiz-Vega, J., Vazquez-Feijoo, J. A., Cruz-Martínez, H., & Cortés-Martínez, 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*, 24(2), 145-157.
- McSorley, R. (2003). Adaptations of nematodes to environmental extremes. *Florida Entomologist*, 86(2), 138-142.
- Miles, C., Blethen, C., Gaugler, R., Shapiro-Ilan, D. I., & Murray, T. (2012). Using entomopathogenic nematodes for crop insect control. Oregon State University Extension Publications. Retrieved from: <http://cru.cahe.wsu.edu/CEPublications/PNW544.pdf>
- Patel, M. N., & Wright, D. J. (1997b). Phospholipids and their fatty acids in infective juveniles of entomopathogenic steinernematid nematodes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 118(3), 649-657.
- Patel, M. N., & Wright, D. J. (1998). The ultrastructure of the cuticle and sheath of infective juveniles of entomopathogenic steinernematid nematodes. *Journal of helminthology*, 72(3), 257-266.
- Patel, M. N., Perry, R. N., & Wright, D. J. (1997a). Desiccation survival and water contents of entomopathogenic nematodes, *Steinernema* spp. (Rhabditida: Steinernematidae). *International Journal for Parasitology*, 27(1), 61-70.
- Patel, S., Kaushal, A. M. & Bansal, A. K. (2007). Effect of particle size and compression force on compaction behavior and derived mathematical parameters of compressibility. *Pharmaceutical research*, 24, 111-124.
- Perez, E. E., Lewis, E. E., & Shapiro-Ilan, D. I. (2003). Impact of the host cadaver on survival and infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: *Steinernematidae* and

- Heterorhabditidae*) under desiccating conditions. *Journal of invertebrate pathology*, 82(2), 111-118.
- Perry, R. N., Ehlers, R. U., & Glazer, I. (2012). A realistic appraisal of methods to enhance desiccation tolerance of entomopathogenic nematodes. *Journal of nematology*, 44(2), 185.
- Petersen, J. J. & Willis O. R. (1972). Procedures for the mass rearing of a mermithid parasite of mosquitoes. *Mosquitoes News* 32, 226-230.
- Picard, A. Davis, R. S. Gläser, M. & Fujii, K. (2008). Revised formula for the density of moist air (CIPM-2007). *Metrologia*, 45(2), 149.
- Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., Niranjana, K., & Knorr, D. (2005). Developments in osmotic dehydration: methods to enhance mass transfer. In: Da-Wen S. (ed). *Trends in Food Science & Technology*, 13(2), 48-59.
- Romero, E., Gens, A. & Lloret, A. (2003). Suction effects on a compacted clay under non-isothermal conditions. *Géotechnique*, 53(1), 65-81.
- Rouquerol, J., Rouquerol, F., & Sing, K. S. (1998). *Adsorption by powders and porous solids*. Academic press.
- Sablani, S. S., Datta, A. K., Rahman, M. S., & Mujumdar, A. S. (2006). Handbook of food and bioprocess modeling techniques; CRC Press: Boca Raton, FL.
- San-Blas, E. (2013). Progress on entomopathogenic nematology research: A bibliometric study of the last three decades: 1980-2010. *Biological Control*.
- Sepúlveda, E., Sáenz, C., Aliaga, E., & Aceituno, C. (2007). Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. *Journal of Arid Environments*, 68(4), 534-545.
- Sepúlveda, E., Sáenz, C., Aliaga, E., & Aceituno, C. (2007). Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. *Journal of Arid Environments*, 68(4), 534-545.
- Shackelford, C. D., & Moore, S. M. (2013). Fickian diffusion of radionuclides for engineered containment barriers: Diffusion coefficients, porosities, and complicating issues. *Engineering Geology*. 152(1), 133-147.
- Shapiro, D. I., & Glazer, I. (1996). Comparison of Entomopathogenic Nematode Dispersal from Infected Hosts Versus Aqueous Suspension. *Environmental Entomology*, 25, 1455-1461.

- Shapiro, D. I., & Lewis, E. E. (1999). Comparison of Entomopathogenic Nematode Infectivity from Infected Hosts Versus Aqueous Suspension. *Environmental Entomology*, 28, 907-911.
- Shapiro, D. I., Behle, R., McGuire, M. R., & Lewis, E. E. (2003a). *U.S. Patent No. 6,524,601*. Washington, DC: U. S. Patent and Trademark Office.
- Shapiro, D.I., Glazer, I. (1996). Comparison of entomopathogenic nematode dispersal from infected hosts versus aqueous suspension. *Environ. Entomol.* 25, 1455–1461.
- Shapiro, D.I., Lewis, E.E. (1999). Comparison of entomopathogenic nematode infectivity from infected hosts versus aqueous suspension. *Biol. Contr.* 28, 907–911.
- 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., Han, R., & Dolinski, C. (2012), Entomopathogenic nematode production and application technology, *Journal of Nematology*, 44, 206-217.
- Shapiro-Ilan, D. I., Lewis, E. E., & Schliekelman, P. (2014). Aggregative group behavior in insect parasitic nematode dispersal. *International journal for parasitology*, 44(1), 49-54.
- Shapiro-Ilan, D. I., Lewis, E. E., & Tedders, W. L. (2003b). Superior efficacy observed in entomopathogenic nematodes applied in infected-host cadavers compared with application in aqueous suspension. *Journal of Invertebrate Pathology*, 83, 270-272.
- Shapiro-Ilan, D. I., Lewis, E. E., Behle, R. W., & McGuire, M. R. (2001). Formulation of Entomopathogenic Nematode-Infected Cadavers. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78, 17-23.
- Shapiro-Ilan, D. I., Morales-Ramos, J. A., Rojas, M. G., & Tedders, W. L. (2010). Effects of a novel entomopathogenic nematode-infected host formulation on cadaver integrity, nematode yield, and suppression of *Diaprepes abbreviatus* and *Aethina tumida*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 103-108.
- Shapiro-Ilan, D. I., Tedders, W. L., & Lewis, E. E. (2008). *U. S. Patent No. 7,374,773*. Washington, DC: U. S. Patent and Trademark Office.

- Sharma, M. P., Sharma, A. N., & Hussaini, S. S. (2011). Entomopathogenic nematodes, a potential microbial biopesticide: mass production and commercialization status - a mini review. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *44*, 855-870.
- Shaw, E. M. Beven, K. J. Chappell, N. A. & Lamb, R. (2011). *Hydrology in practice*; Spon press: London, 2011.
- Silver, S. C., Dunlop, D. B., & Grove, D. I. (1995). *WIPO Patent No. WO 95/0577*. Geneva, Switzerland: World Intellectual Property Organization.
- Smith, G. D. (1985). *Numerical solution of partial differential equations: finite difference methods*. Oxford University Press.
- Spence, K. O., Stevens, G. N., Arimoto, H., Ruiz-Vega, J., Kaya, H. K., & Lewis E. E. (2011). Effect of insect cadaver desiccation and soil water potential during rehydration on entomopathogenic nematode (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) production and virulence. *Journal of Invertebrate Pathology*, *106*, 268-272.
- Steiner, G. (1929). *Neoplectana glaseri* ng, n. sp.(Oxyuridae) a new nemic parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newm.). *Journal of the Washington Academy of Science*, *19*, 436-440.
- Strauch, O., Niemann, I., Neumann, A., Schmidt, A. J., Peters, A., & Ehlers, R. -U. (2000). Storage and formulation of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis indica* and *H. bacteriophora*. *BioControl*, *45*, 483-500.
- Strauch, O., Oestergaard, J., Hollmer, S., & Ehlers, R.-U. (2004). Genetic improvement of the desiccation tolerance of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* through selective breeding. *Biological Control*, *31*, 218-226.
- Táborský, V. (1992). *Small-scale processing of microbial pesticides* (No. 96). Food & Agriculture Org.
- Tan, J., Cheng, S. M., Loganath, A., Chong, Y. S., & Obbard, J. P. (2007). Selected organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in house dust in Singapore. *Chemosphere*, *68*, 1675-1682.
- Treonis, A. M., Wall, D. H., & Virginia, R. A. (2000). The use of anhydrobiosis by soil nematodes in the Antarctic Dry Valleys. *Functional Ecology*, *14*(4), 460-467.

- Wharton, D. A. (2002). Life at the limits: organisms in extreme environments. *Cambridge University press Cambridge*, 14, 427-431.
- White, G. F. (1927). A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*, 66(1709), 302-303.
- Winston, P. W., & Bates, D. H. (1960). Saturated solutions for the control of humidity in biological research. *Ecology*, 41(1), 232-237.
- Womersley, C.Z., Higa, L.M., Wharton, D.H. (1998). Survival biology. In: Perry, R.N., Wright, D.J. (Eds.), *The Physiology and Biochemistry of Free-Living and Plant-Parasitic Nematodes*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 271–302.
- Yukawa, T., & Pitt, J. M. (1985). *WIPO Patent No. WO 85/03412*. Geneva, Switzerland: World Intellectual Property Organization.
- Zhang, J., & Datta, A. K. (2004). Some considerations in modeling of moisture transport in heating of hygroscopic materials. *Drying Technology*, 22(8), 1983-2008.

# ***ANEXOS***

**Anexo 1. Propiedades físicas y químicas típicas de la tierra de diatomeas (Celite® 209).**

<p><b>Propiedades físicas típicas</b></p>	<p>Área superficial BET, m<sup>2</sup>/g: 10-20  Gravedad específica: 2.10  Pérdida de peso, lb·ft<sup>3</sup>: 8  Absorción de aceite % por peso: 175  pH: 7  Humedad, % máximo: 6  Índice refractivo: 1.43  Análisis de pantalla: 150 mesh, 0 %; 325 mesh, 0.5 %  d50, Cilas granulometro, Micrones: 7  Densidad: 220 kg/m<sup>3</sup>  Porosidad total: 0.725</p>
<p><b>Análisis químico típico, % Peso</b></p>	<p>SiO<sub>2</sub>: 86.7, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 3.3, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 1.2, CaO: 0.5, MgO: 0.5,  Na<sub>2</sub>O + K<sub>2</sub>O: 0.8, pérdida por ignición: 3.6, otros: 2.9</p>
<p><b>Propiedades térmicas</b></p>	<p>Capacidad calorífica: 8.4×10<sup>-2</sup> J/kg·K  Conductividad térmica: 0.05 W/m·K</p>

Datos recopilados de hojas de datos de Celite Corporation y Wetly et al. (2008).

## Anexo 2. Encuesta de recolección de los requerimientos del usuario

### ESTUDIO PARA EL DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN PARA *S. glaseri*

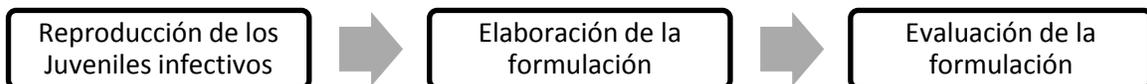
En el CIIDIR Oaxaca, el equipo de trabajo de la línea de investigación en formulación de agentes entomopatógenos desea probar la efectividad de una nueva formulación con el nematodo *S. glaseri* contra larvas de *P. vetula*. Por lo cual, se ha emprendido la modificación del diseño existente para conseguir uno de mejor desempeño en pruebas de laboratorio; como una etapa de aseguramiento de la calidad antes de la prueba en campo. Los principales aspectos deseados en el diseño son: extender el tiempo de supervivencia de *S. glaseri* a temperatura y HR ambientales y controlar efectivamente a las larvas de *P. vetula* en bioensayos de laboratorio.

Para el diseño de la nueva formulación se usará el método propuesto por Haik (2010). En este modelo se consideran las aportaciones de las personas que ejecutan alguna(s) de las fase(s) del proyecto para establecer los requerimientos (aquellas cosas que la formulación debe hacer y/o lograr) en las primeras etapas de su diseño. Esta estrategia de diseño permite ahorrar tiempo en las modificaciones que pudieran hacerse durante el proceso de materialización del objeto de diseño.

Como un involucrado en el proceso de desarrollo de la formulación, solicitamos su colaboración para hacernos saber los requerimientos que usted desea en la nueva formulación, Esta lista será proporcionada al diseñador para que sirva de punto de partida.

El procedimiento a seguir es:

1. identifique su área de participación en alguna de las tres fases del proceso de desarrollo de la formulación y márquela.



2. elija el tipo de participación que mejor lo describa.

Laboratorista

Investigador

Formulador

Otro, describa: \_\_\_\_\_

3. enliste sus requerimientos funcionales para la nueva formulación. En esta etapa no aporte soluciones específicas.

### Anexo 3. Resultados de la encuesta de importancia de los requerimientos

Etapa	Requerimiento	Usuario J	Usuario R	Usuario S	Usuario A
Reproducción de	Sencillo	8	10	6	8
	Barato	6	8	7	8
	de alta producción de JI por hora-hombre invertidas	9	10	8	8
	que prepare a los JI para la formulación	7	8	8	10
	que preserve la patogenicidad de los JI	9	8	10	10
	que mejore la infectividad contra el insecto plaga	10	10	9	10
	Proteger a los JI de los factores bióticos	9	7	7	10
	Aumentar el tiempo de supervivencia de los JI	10	10	10	8
	Mantener la infectividad de los JI	10	10	10	10
	Para almacenaje a temperatura y HR ambientales	9	8	9	8
Elaboración de la formulación	Resistencia al manejo durante el almacenaje y transporte	9	9	9	10
	Contener JI en alta concentración	6	9	9	8
	Producirse masivamente	9	8	8	8
	Preservar la viabilidad de los JI	9	8	10	10
	Evitar la desecación de los JI	8	9	9	10
	Suministrar nutrientes solamente para mantenimiento	6	6	8	8
	Fácil de elaborar	10	8	8	8
	Fácil de empacar y desempacar	9	9	8	8
	Sin variación significativa de su funcionalidad a temperatura ambiente	9	10	8	8
	Cause alta mortalidad de la plaga	10	10	10	10
Evaluación de la formulación	Aumente el contacto con la plaga	7	8	9	10
	Aumente la interacción con la plaga	9	8	9	9
	Fácil de usar	10	8	9	8
	Producto de características uniformes	8	9	9	10
	Alta viabilidad de los JI	9	10	10	10
	Alta infectividad contra la plaga	10	9	10	10
	Soluble en agua	9	10	8	10
	Fácil de aplicar	9	9	8	8
	Virulencia > 60%	8	9	9	10

## **Anexo 4. Productividad relevante**

### ***Artículos científicos en revistas del JCR***

Cortés-Martínez, C. I. Sandoval-Torres, S., & Ruiz-Vega, J. (2016). Analysis of moisture transport in diatomaceous earth pellets elaborated to contain entomopathogenic nematodes. *Drying Technology* (en preparación).

Cortés-Martínez, C. I. Ruiz-Vega, J., Lewis, E. E., Aquino-Bolaños, T., & Martínez-Gutiérrez, G. A. (2016). Mechanical production of pellets for the application of entomopathogenic nematodes: effect of pre-acclimation of *Steinernema glaseri* in the survival time and infectivity against *Phyllophaga vetula*. *Biocontrol Science and Technology* (bajo correcciones).

Cortés-Martínez, C. I. Ruiz-Vega, J., Matadamas-Ortiz, P. T., Lewis, E. E., Aquino-Bolaños, T., & Navarro-Antonio, J. (2016). Effect of moisture evaporation from diatomaceous earth pellets on storage stability of *Steinernema glaseri*. *Biocontrol Science and Technology*, 26(3), 305-319. DOI: 10.1080/09583157.2015.1104650

### ***Artículos en extenso en memoria de Congresos Internacionales***

Cortés-Martínez, C. I. Ruiz-Vega, J., Lewis, E.E., Matadamas-Ortiz, P. T., & Xing-Yue, L. (2014). Contenido de humedad en agregados granulares de tierra diatomea y su efecto sobre la supervivencia e infectividad de *Steinernema glaseri*. Memoria del XI Congreso Latinoamericano de Ingeniería Agrícola y del XXIII Congreso Nacional de Ingeniería Agrícola. 6-10 de octubre, Cancún, México. ISBN: 978-607-12-0356-4.

Cortés-Martínez, C. I. Matadamas-Ortiz, P. T. Ruiz-Vega, J. & Vazquez-Feijoo, J. A. (2013). Desarrollo de un modelo de Flujo de humedad de bioplaguicidas granulares para nematodos entomopatógenos. Memoria del XXII Congreso Nacional y 1er Congreso Internacional de Ingeniería Agrícola. 19-20 de septiembre, Chapingo, México. ISBN: 978-607-37-0070-0.

### ***Resúmenes en memoria de Congresos Internacionales***

Carlos I. Cortés-Martínez, Jaime Ruiz-Vega and Edwin E. Lewis. (2015). Improved survival time of infective juveniles of *Steinernema glaseri* collected on plaster Paris. In: SIP (Eds.): International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control and 48th Annual Meeting of the Society of Invertebrate Pathology: Program and Abstract book, pp. 93. Vancouver, British Columbia, Canada.

Jaime Ruiz-Vega, Teodulfo Aquino-Bolaños, Juan R. Delgado-Gamboa and Carlos I. Cortés-Martínez. (2014). Osmotic stress tolerance and infective juvenile production of entomopathogenic nematodes subject to fast host desiccation treatments. In: SIP (Eds.): International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control and 47th Annual Meeting of the Society of Invertebrate Pathology: Program and Abstract book, pp. 126. Mainz, Germany. ISSN: 1866-590X.

### ***Artículos en extenso en memorias de Congresos Nacionales***

Ruiz-Vega, J., Cortés-Martínez, C. I., Aquino-Bolaños, T., Delgado-Gamboa, J. R. & Hernández-Cruz, J. (2015). Tiempo de supervivencia de *Steinernema glaseri* en bioplaguicidas granulares y mortalidad de larvas de *Phyllophaga* spp. IX Congreso Nacional de Bioingeniería y Biotecnología. Guadalajara, Jalisco.

Cortés-Martínez, C. I., Ruiz-Vega, J., Navarro-Antonio, J., & Vazquez-Feijoo, J. (2015). Tiempo de supervivencia de *Steinernema glaseri* en dos bioplaguicidas granulares elaborados por métodos mecánicos. IX Congreso Nacional de Bioingeniería y Biotecnología. Guadalajara, Jalisco.

Cortés-Martínez, C. I. Matadamas-Ortiz, P. T. & Ruiz-Vega, J. (2013). Análisis de la desecación de nematodos entomopatógenos en pellets de arcillas higroscópicas. Memorias del XXXVI Congreso Nacional de Control Biológico, 3-8 de noviembre, Oaxaca, México.

Cortés-Martínez, C. I. Matadamas-Ortiz, P. T. & Ruiz-Vega, J. (2013). Nuevo principio de nucleación de nematodos entomopatógenos en arcillas higroscópicas. Memorias del XXXVI Congreso Nacional de Control Biológico, 3-8 de noviembre, Oaxaca, México.

Cortés-Martínez, C. I., Matadamas-Ortiz, P. T. & Ruiz-Vega, J. (2013). Ingeniería de Pellets con Nematodos Entomopatógenos. *Entomología Mexicana*, 12, 370-375. ISBN: 978-607-715-108-1.

### ***Ponencias en Congresos Institucionales***

Cortés-Martínez, C. I., Ruiz-Vega. (2015). Contenido de humedad en pellets de tierra diatomea y supervivencia de juveniles infectivos de *Steinernema glaseri*. Foro BEIFI 10ª Edición.

Cortés-Martínez, C. I., Ruiz-Vega, J., Vázquez-Feijoo, J. A. & Navarro-Antonio, J. (2014). Modelación del contenido de humedad en agregados de tierra diatomea para alojar nematodos entomopatógenos de uso agrícola. Foro BEIFI 9ª Edición. 27 y 28 de mayo.

Cortés-Martínez, C. I., Ruiz-Vega, J., Navarro-Antonio, J., & Franco-Lujan, V. A. (2014). Modelación de factores de retención de la humedad en agregados granulares para nematodos entomopatógenos. IX Congreso Nacional Estudiantil de Investigación. México, D. F.

Cortés-Martínez, C. I. Matadamas-Ortiz, P. T. Ruiz-Vega, J. & Vázquez-Feijoo, J. A. (2013). Estimación del contenido de humedad de arcillas higroscópicas por modelización matemática. Memorias de las IX Jornadas Politécnicas de Investigación en Ciencia y Tecnología. 11-14 de Noviembre de 2013. Oaxaca, México.