

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**IMPLEMENTACION DE UN SISTEMA DE CRIA
MASIVA "in vitro" DE LOS ECTOPARASITOIDES
DE *Anthonomus grandis* y *Anthonomus eugeni***

POR

MARIA DE LA PAZ TIJERINA GARZA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRICOLAS
CON ESPECIALIDAD EN PARASITOLOGIA**

JULIO DE 1997

DE UN SISTEMA DE CRIA
LOS ECTOPARASITOIDES

TD
SB945
.C8
T544
1997
c.1

MPLE
MASIN

DE *Anthonomus grandis* y *Anthonomus eugenii*





1080110343

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMIA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



IMPLEMENTACION DE UN SISTEMA DE CRIA
MASIVA "in vitro" DE LOS ECTOPARASITOIDES
DE *Anthonomus grandis* y *Anthonomus eugenii*

POR

MARIA DE LA PAZ TIJERINA GARZA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRICOLAS
CON ESPECIALIDAD EN PARASITOLOGIA

JULIO DE 1997



TD
SB94S

.C8

T544

1997

C1



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON.

FACULTAD DE AGRONOMIA.

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO.



IMPLEMENTACION DE UN SISTEMA DE CRIA MASIVA
"in vitro" DE LOS ECTOPARASITOIDES
DE *Anthonomus grandis* y *Anthonomus eugenii*

POR

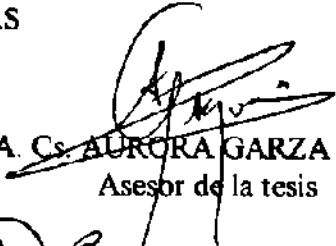
MARIA DE LA PAZ TIJERINA GARZA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRICOLAS CON
ESPECIALIDAD EN PARASITOLOGIA DE POSTCOSECHA

Julio, 1997.

IMPLEMENTACION DE UN SISTEMA DE CRIA MASIVA
"in vitro" DE LOS ECTOPARASITOIDES
DE *Anthonomus grandis* y *Anthonomus eugeni*

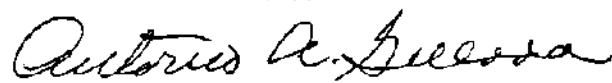
Aprobación de la tesis


DRA. Cs. AURORA GARZA ZUÑIGA.
Asesor de la tesis


Ph. D. JOSE LUIS DE LA GARZA GONZALEZ
Coasesor


Ph. D. JOSUE LEOS MARTINEZ
Coasesor


Ph. D. RIGOBERTO GONZALEZ GONZALEZ.
Coasesor


Ph. D. ANTONIO A. GUERRA
Coasesor externo


Ph. D. FRANCISCO ZAVALA
Subdirector de Estudios de Postgrado.

Julio, 1997.

**Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias
Biológicas de la U.A.N.L.**

y

**en el Laboratorio de Investigaciones Agrícolas Subtropicales del Departamento de
Agricultura de los Estados Unidos en Weslaco, TX.**

DEDICATORIA

A mi familia, por comprender mis sueños y apoyarlos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi mas sincero agradecimiento a la Dra Cs. Aurora Garza Zúñiga por aceptar el compromiso de asesorar mi tesis doctoral.

Al Ph. D. Antonio A. Guerra por confiar en mi y porque con su apoyo tuve la oportunidad de realizar el presente estudio.

A los Doctores Ph. D. Jose Luis De la Garza González, Ph D. Josué Leos Martínez y Ph. D. Rigoberto González González por su apoyo en el desarrollo del presente estudio, a todos ustedes, gracias por formar parte del Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias e interés en la revisión del presente estudio.

A la Q.I. M.C. María Hilda Garza por su asesoría y apoyo invaluable y por permitirme utilizar equipo y materiales en su laboratorio de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Al Dr. Emilio Olivares Sáenz, por la orientación y asesoría brindada en materia estadística.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios, especialmente al Lic. Humberto Valencia Salazar.

Al Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) y en especial al Dr. Edgar King, Director de la Unidad de Investigaciones para el Control Biológico de Plagas en Weslaco, TX por las facilidades otorgadas.

Y a todas las personas que desinteresadamente, de una u otra manera me ayudaron, a todas ellas mi más sincero agradecimiento.

CONTENIDO

CAPITULO	PÁGINA
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Contenido.....	vi
Indice de Tablas.....	1
Indice de Figuras.....	5
Resumen.....	8
Abstract.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. ANTECEDENTES.....	14
2.1 Uso de microbicidas para el control de microorganismos.....	14
2.2 Estimación de pérdidas.....	15
2.3 Biología y hábitos de <i>Anthonomus grandis</i>	16
2.3.1 Biología y hábitos de <i>A. eugenii</i>	17
2.3.2 Biología Ecología y Comportamiento de Insectos parasitoides....	18
2.4 Hospederos	19
2.5 Cría de Insectos.....	20
2.6 Materiales utilizados para cría.....	21
2.7 Entomopatógenos Importantes.....	22
2.7.1 Virus.....	22
2.7.2 Bacterias.....	23
2.7.3 Hongos.....	24
3. OBJETIVOS.....	25
4. HIPOTESIS.....	26
5. MATERIAL Y METODOS.....	27
5.1 Pruebas Microbiológicas.....	27
5.2 Sitios de muestreo.....	28
5.2.1 Material biológico.....	28
5.2.2 Medios de cultivo.....	28

CAPITULO	PÁGINA
5.2.3 Materiales del sistema de cría.....	28
5.3 Metodología.....	28
5.3.1 Aislamiento de bacterias y hongos	29
5.3.1.1 Bacterias.....	29
5.3.1.2 Hongos.....	29
5.4 Identificación de bacterias.....	29
5.5 Pruebas de Sensibilidad.....	30
5.6 Contaminación de huevecillos.....	31
5.7 Evaluación de conservadores adicionados a la dieta estándar del parasitoide.....	32
5.8 Evaluación de varios microbicidas para el control de microorganismos aislados del sistema de cría de <i>C. grandis</i>	32
5.8.1 Acción bactericida del ClO ₂ y de las sales cuaternarias de amonio	33
5.8.1.1 Preparación de las diluciones para los tubos de prueba..	33
5.8.1.2 Efecto " <i>in vitro</i> " de cuatro sustancias fungicidas en el crecimiento de hongos encontrados en el sistema de cría masiva de <i>C. grandis</i>	34
5.9 Evaluación de materiales para proteger las oviposiciones y coleccionar los huevecillos de los parasitoides.....	35
5.10 Análisis de la información.....	35
6. RESULTADOS Y DISCUSION.....	39
6.1 Pruebas Microbiológicas. Microorganismos aislados.....	39
6.2 Sensibilidad de las bacterias aisladas a diversos agentes antimicrobianos....	39
6.3 Contaminación de huevecillos. Efecto de diferentes sustancias desinfectantes sobre la flora bacteriana presente en los huevecillos del parasitoide.....	43
6.4 Evaluación de conservadores adicionados a la dieta estándar del parasitoide.....	49

CAPITULO	PÁGINA
6.5 Evaluación de diversos tratamientos con microbicidas para prevenir la contaminación microbiana del equipo y materiales del sistema de cría de <i>C. grandis</i>	54
6.6 Evaluación de materiales para proteger las oviposiciones y coleccionar los huevecillos de los parasitoides.....	60
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	75
8. LITERATURA CITADA.....	77
9. APENDICE.....	84
Plan general de trabajo	
Metodología para diferenciación bioquímica de bacterias	
Diagrama de flujo para identificación de bacterias	
Diagrama de flujo para identificación de bacterias. Pruebas bioquímicas	
Diagrama de flujo para identificación de hongos	
Diagrama de flujo para determinar sensibilidad a los antimicrobianos	
Diagrama de flujo para evaluación de microbicidas en bacterias	
Diagrama de flujo para evaluación de microbicidas en hongos	
Abreviaturas	

INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
Tabla 1.	Bacterias aisladas en el sistema de cría masiva de <i>C. grandis</i> (Burks). algunas de las cuales son consideradas patógenas de insectos.....	40
Tabla 2.	Hongos aislados del sistema de cría masiva de <i>C. grandis</i> (Burks). algunos de los cuales son considerados patógenos de insectos.....	41
Tabla 3.	Sensibilidad a diferentes antimicrobianos de bacterias aisladas de un sistema de cría masiva de <i>C. grandis</i>	42
Tabla 4.	Acción germicida del iodo sobre la flora bacteriana presente en huevecillos de <i>C. grandis</i> (agua de enjuague) en diferentes tiempos y concentraciones.....	44
Tabla 5.	Acción germicida del Sulfato de Cobre sobre la flora bacteriana presente en huevecillos de <i>C. grandis</i> (agua de enjuague) en diferentes tiempos y concentraciones.....	45
Tabla 6.	Acción germicida del hipoclorito sobre la flora bacteriana presente en huevecillos de <i>C. grandis</i> (agua de enjuague) en diferentes tiempos y concentraciones.....	45

Tabla	Página
Tabla 7. Acción germicida del alcohol etílico sobre la flora bacteriana presente en huevecillos de <i>C. grandis</i> (agua de enjuague) en diferentes tiempos y concentraciones.....	46
Tabla 8. Análisis de varianza de los datos de eclosión de los huevecillos de <i>C. grandis</i> después de utilizar cuatro microbicidas en cuatro concentraciones y tres tiempos diferentes.....	46
Tabla 9. Análisis de las medias de tratamientos de la interacción de: Sustancias, Tiempos y Concentraciones y su relación con huevecillos de <i>C. grandis</i>	47
Tabla 10. Análisis de varianza del número de colonias después de utilizar 4 microbicidas en 4 concentraciones y 3 tiempos diferentes para el lavado de huevecillos de <i>C. grandis</i>	48
Tabla 11: Análisis de las medias de tratamientos de la interacción de: Sustancias, Tiempos y Concentraciones de colonias de bacterias que crecieron después de utilizar diversos tratamientos para el lavado de huevecillos de <i>C. grandis</i>	49
Tabla 12. Análisis de varianza de los datos de eclosión de huevecillos de <i>C. grandis</i> tratados y no tratados con iodo 0.63%/1 min. colocados en tres dietas con diferentes combinaciones de inhibidores.....	50

Tabla	Página
Tabla 13. Promedio de eclosión de huevecillos de <i>C. grandis</i> en dietas con diferentes combinaciones de microorganismos.....	50
Tabla 14. Análisis de varianza de los resultados de la evaluación de la dieta estándar (Guerra, 1993) y dietas 1 y 2 utilizando huevecillos de <i>C. grandis</i> lavados y sin lavar con iodo 0.63%/1min. y su relación con la emergencia de adultos.....	51
Tabla 15. Emergencia de adultos de <i>C. grandis</i> en dietas con diferentes combinaciones de inhibidores de microorganismos.....	51
Tabla 16. Análisis de varianza del desarrollo de colonias de hongos en tres dietas con diferentes combinaciones de inhibidores en huevecillos de <i>C. grandis</i> con y sin iodo 0.63%/ 1min.....	52
Tabla 17. Número de colonias de hongos en 3 dietas para cría masiva de <i>C. grandis</i> utilizando diferentes combinaciones de inhibidores y huevecillos tratados y sin tratar con iodo.....	53
Tabla 18. Análisis de varianza del crecimiento de colonias de bacterias en tres dietas con diferentes combinaciones de inhibidores y huevecillos de <i>C. grandis</i> lavados y sin lavar con iodo 0.63% / 1 min.....	53
Tabla 19. Concentración mínima inhibitoria (CMI) en ppm del dióxido de cloro para diferentes bacterias aisladas del sistema de cría masiva de <i>C. grandis</i>	55

Tabla	Página
Tabla 20. Concentración mínima inhibitoria (CMI) en ppm de las sales cuaternarias de amonio (TIMSEN) para diferentes bacterias aisladas del sistema de cría masiva de <i>C. grandis</i>	56
Tabla 21. Efecto de dióxido de cloro sobre el crecimiento " <i>in vitro</i> " de hongos aislados del sistema de cría masiva de <i>C. grandis</i> en diferentes concentraciones.....	57
Tabla 22. Efecto de las sales cuaternarias de amonio (TIMSEN) sobre el crecimiento " <i>in vitro</i> " de hongos aislados en el sistema de cría masiva de <i>C. grandis</i> en diferentes concentraciones.....	58
Tabla 23. Efecto del fungicida mancozeb sobre el crecimiento " <i>in vitro</i> " de hongos aislados en el sistema de cría masiva de <i>C. grandis</i> en diferentes concentraciones.....	59
Tabla 24. Efecto del fungicida benomil sobre el crecimiento " <i>in vitro</i> " de hongos aislados en el sistema de cría masiva de <i>C. grandis</i> en diferentes concentraciones.....	59
Tabla 25. Evaluación de membranas como cubiertas de cámaras de cría para <i>C. grandis</i>	61

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1.	Sistema de cría " <i>in vitro</i> " de <i>C. grandis</i>	36
Figura 2.	Bomba de vacío.....	37
Figura 3.	Esquema de siembra por estría cruzada.....	37
Figura 4.	Técnica lactofenol-azul de algodón.....	38
Figura 5.	Cámara de Henrici.....	38
Figura 6	Acción germicida del yodo sobre la flora bacteriana presente en huevecillos de <i>C. grandis</i> (agua de enjuague) a un tiempo de exposición de 60 segundos en diferentes concentraciones.....	62
Figura 7.	Acción germicida del yodo sobre la flora bacteriana presente en huevecillos de <i>C. grandis</i> (agua de enjuague) a un tiempo de exposición de 120 segundos en diferentes concentraciones.....	63
Figura 8.	Acción germicida del yodo sobre la flora bacteriana presente en huevecillos de <i>C. grandis</i> (agua de enjuague) a un tiempo de exposición de 180 segundos en diferentes concentraciones.....	64
Figura 9.	Flora bacteriana presente en huevecillos de <i>C. grandis</i> en el testigo (agua de enjuague sin germicida).....	65

Figura	Página
Figura 10. Acción germicida del sulfato de cobre sobre la flora bacteriana presente en huevecillos de <i>C. grandis</i> (agua de enjuague) a un tiempo de exposición de 60 segundos en diferentes concentraciones.....	66
Figura 11. Acción germicida del sulfato de cobre sobre la flora bacteriana presente en huevecillos de <i>C. grandis</i> (agua de enjuague) a un tiempo de exposición de 120 segundos en diferentes concentraciones.....	67
Figura 12. Acción germicida del sulfato de cobre sobre la flora bacteriana presente en huevecillos de <i>C. grandis</i> (agua de enjuague) a un tiempo de exposición de 180 segundos en diferentes concentraciones.....	68
Figura 13. Acción germicida del hipoclorito sobre la flora bacteriana presente en huevecillos de <i>C. grandis</i> (agua de enjuague) a un tiempo de exposición de 60 segundos en diferentes concentraciones.....	69
Figura 14. Acción germicida del hipoclorito sobre la flora bacteriana presente en huevecillos de <i>C. grandis</i> (agua de enjuague) a un tiempo de exposición de 120 segundos en diferentes concentraciones.....	70

Figura 15.	Acción germicida del hipoclorito sobre la flora bacteriana presente en huevecillos de <i>C. grandis</i> (agua de enjuague) a un tiempo de exposición de 180 segundos en diferentes concentraciones.....	71
Figura 16.	Acción germicida del alcohol etílico sobre la flora bacteriana presente en huevecillos de <i>C. grandis</i> (agua de enjuague) a un tiempo de exposición de 60 segundos en diferentes concentraciones.....	72
Figura 17.	Acción germicida del alcohol etílico sobre la flora bacteriana presente en huevecillos de <i>C. grandis</i> (agua de enjuague) a un tiempo de exposición de 120 segundos en diferentes concentraciones.....	73
Figura 18.	Acción germicida del alcohol etílico sobre la flora bacteriana presente en huevecillos de <i>C. grandis</i> (agua de enjuague) a un tiempo de exposición de 180 segundos en diferentes concentraciones....	74

RESUMEN.

El objetivo del presente estudio fue incrementar la eficiencia del sistema de cría masiva *in vitro* de *Catolaccus grandis*, para lo cual se aislaron e identificaron las bacterias y hongos presentes en el sistema y se estudió la susceptibilidad de las primeras a diversos microbicidas. Asimismo, se evaluaron algunas técnicas para eliminar los microorganismos presentes en los huevecillos y diversas sustancias para prevenir la contaminación de la dieta. Se probó la eficiencia de tres membranas sintéticas que sirvieran como sustituto del Parafilm para proteger las cámaras de cría. Se realizaron análisis microbiológicos en el material biológico, dieta y medio ambiente en el sistema. Las bacterias aisladas en los diferentes sitios fueron: *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans*, *Micrococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Salmonella* sp. y *Serratia marcescens* las cuales presentaron sensibilidad hacia Amikacina y Netilmicina, los hongos aislados fueron: *Aspergillus* spp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Metarrhizium* sp., y *Beauveria bassiana*. Para la eliminación de microorganismos de huevecillos el más eficiente fue el yodo al 0.63%/ 1min. Se realizaron diferentes evaluaciones para el control de contaminantes sin alterar el ciclo vital de los parasitoides. El conservador más eficiente para la dieta fue una mezcla de sorbato de potasio y benzoato de sodio, ambos a 0.032%. Como sustituto del Parafilm resultó con la misma eficiencia una membrana de polietileno comercial con un costo 55 veces más bajo. Los efectos de dos microbicidas y dos fungicidas fueron evaluados "in vitro" sobre las bacterias: *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans*, *Aeromonas hydrophila* y *Salmonella* sp. y los hongos: *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium* sp. y *Rhizopus* sp. aislados del sistema de cría masiva de *Catolaccus grandis*. La susceptibilidad de las bacterias y hongos a los microbicidas fue variable. Los compuestos cuaternarios de amonio resultaron más efectivos para el control tanto de bacterias como de hongos. Mancozeb y benomil fueron efectivos para el control de hongos hasta cinco días post-inoculación. Sin embargo, benomil tuvo un efecto más duradero inhibiendo el desarrollo de los hongos hasta 14 días post-inoculación. Al tomar en cuenta los resultados obtenidos en todas las evaluaciones

realizadas se concluye que al disminuir la contaminación microbiana en el sistema de cría se logra una mayor producción y mejor calidad de los parasitoides.

ABSTRACT.

The objective of this study was to increase the efficiency of the *Catolaccus grandis* rearing system, so; fungi and bacteria were isolated and identified, and their sensibility to microbicides was evaluated; and evaluation of egg surface disinfectants to prevent contamination of the diet. Efficiency of three syntetic plastic membranes were evaluated as a Parafilm substitute to protect the standard rearing plate cover. Microbiological analysis was from biological material diet and environment. Isolated bacteria were *Aeromonas hydrophila*; *Citrobacter freundii*; *Enterobacter agglomerans*; *Micrococcus* sp. ; *Pseudomonas aeruginosa*; *P. fluorescens*; *Salmonella* sp. and *Serratia marcescens*, which were sensitive only to amikacine and netilmicin as well as *Aspergillus* sp.; *Penicillium* sp.; *Rhizopus* sp. *Metarrizium* sp. and *Beauveria bassiana*. Results of evaluating egg surface contaminants indicated that a one minute exposure to iodine 0.63 % was the most efficient. Evaluation to control diet contaminants without modifying the parasitoids biological cycle was made. The most efficient diet antimicrobial combination was with 0.032 % potasium sorbate-sodium sorbate. Parafilm can be succesfully replaced by a polythilene plastic membrane that is aproximately 55 times cheaper. The effects of two microbicides and two fungicides were evaluated "in vitro" on the bacteria *Pseudomonas flourescens*, *P. aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans*, *Aeromonas hydrophila* and *Salmonella* sp; and the fungi *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium* sp. and *Rhizopus* sp. isolated from the mass rearing system of *Catolaccus grandis*. The susceptibilty of the bacteria and fungi to the microbicides varied. The cuaternary ammonium compound was most effective to control both bacteria and fungi. Mancozeb and benomyl effectively controlled the fungi for five days. However, benomyl had a longer lasting effect inhibiting fungal growth for 14 days after inoculation. Considering results in all the evaluations it is concluded that if microbial contamination is reduced in the rearing system, it is possible to achieve a better production and quality of the parasitoids.

1. INTRODUCCION

Los insectos plaga que afectan a las cosechas son responsables de grandes pérdidas económicas tanto en Estados Unidos como en México, Centro y Sudamérica.

El picudo del algodón *Anthonomus grandis* Boheman y el del chile *A. eugenii* Cano son de gran importancia económica en los lugares donde se comercializan estos cultivos, llegando a ocasionar pérdidas que exceden los 600 millones de dólares anuales tan solo en los Estados Unidos. El control químico de estos insectos es costoso y siempre ineficiente debido a características del ciclo biológico y al desarrollo de resistencia, lo que contribuye a una peligrosa contaminación del medio ambiente. En ambas especies, las hembras ovipositan en botones florales (cuadro) y frutos (bellota), el desarrollo larval de este insecto que es el estadio más susceptible de controlar y el de pupa se completan en el interior de estas estructuras, bien protegidos de insecticidas y otras condiciones adversas, lo que asegura una alta tasa de supervivencia.

A través del tiempo, el problema de controlar las plagas no ha disminuído, sino por el contrario ha propiciado el desarrollo de resistencia de los insectos a los productos químicos y han aumentado las restricciones a las sustancias químicas que contaminan el ambiente. Esto, aunado a una mayor concientización de que el control de plagas debe llevarse a cabo con mínimos efectos en las poblaciones naturales de insectos benéficos ha propiciado un mayor interés y preocupación para la búsqueda de alternativas.

Los daños ocasionados al medio ambiente (agua, suelo, salud humana) y la presión de los ecologistas han propiciado cambios en las técnicas utilizadas en la agricultura para el control de plagas. Se han desarrollado métodos alternativos para el control natural de estas plagas y actualmente, el método mas prometedor para el control de estos picudos es la utilización de insectos parasitoides en un programa de control biológico por aumento, sin embargo, esto implica la utilización de un gran número de estos parasitoides.

Las condiciones del ambiente de cría favorecen que bacterias no patógenas en otras circunstancias, tales como *Serratia sp.*, causen enfermedad en insectos confinados, llegando a provocar hasta 85% de mortalidad en larvas y adultos; y hongos contaminantes muy comunes en sistemas de cría masiva de insectos como *Aspergillus spp.*, afectan los programas de cultivo de diversas maneras (Baumhover, 1977).

La contaminación microbiana es uno de los principales problemas en los sistemas de cría masiva de insectos. Los microorganismos que se encuentran en los insectarios son por lo general inocuos a insectos, pero los factores estresantes a que son sometidos los insectos como cambios en la dieta, exposición a cambios de temperatura, de humedad o toxinas pueden favorecer su multiplicación en los tejidos de los hospederos debilitados y causarles enfermedad. Los cambios bioquímicos producidos por los microorganismos alteran el valor nutricional de la dieta reduciendo el número de insectos producidos y su calidad (Sikorowsky y Lawrence 1994).

La flora microbiana de insectos silvestres y de insectario es diferente. La flora contenida en insectos silvestres forma parte de una asociación relacionada con su ecosistema que data de mucho tiempo atrás; en comparación con la flora microbiana de los de insectario que consiste tanto de flora microbiana humana como del ambiente del laboratorio. Los microorganismos oportunistas, tanto bacterias como hongos pueden, si las condiciones son favorables actuar como patógenos (Sikorowsky y Lawrence, 1994).

Los efectos de la contaminación microbiana en el desarrollo de insectos son influenciados por las especies de microorganismos presentes, la etapa y edad del insecto al momento de la contaminación, la temperatura, el pH del medio, etc. Los hongos más frecuentemente asociados con instalaciones de cultivo masivo son: *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.* y levaduras (Shapiro, 1984). El más común de los hongos asociados a dietas es *A. niger*; los efectos varían principalmente dependiendo de

la edad de la larva al momento de la contaminación , siendo más afectadas las que están en sus primeras etapas.

Los huevecillos que se obtienen de cultivo "*in vivo*" del parasitoide también están contaminados por varios tipos de microorganismos presentes en el medio ambiente de cría o acarreados por humanos. Conservadores químicos y antimicrobianos son usados rutinariamente al preparar dietas para insectos susceptibles de contaminarse. Estas sustancias pueden ser conservadores de los utilizados en alimentos para el hombre o antibióticos (Singh y Bucher, 1971). Sikorowsky y col. (1980), utilizaron diversos tipos de compuestos para la esterilización de la superficie de huevecillos de diferentes especies de insectos.

Las liberaciones aumentativas de insectos parasitoides para el control de plagas agrícolas han probado ser efectivas. Se ha comprobado que *Catolaccus grandis* es eficiente en el control del picudo del algodón, pero un requisito fundamental es contar con grandes cantidades de insectos; lo cual no siempre se logra, ya que problemas inherentes a la producción masiva "*in vivo*" y problemas de contaminación por microorganismos en la cría masiva "*in vitro*" afectan la producción. (Morales-Ramos y col. 1995; Guerra y col. 1994).

Los avances logrados por Guerra y col. (1993, 1994) son anulados al menos en parte por la presencia de microorganismos contaminantes en la dieta y sistema de cría, resultando en menor calidad de los insectos y mayor costo de producción.

Los microorganismos afectan el cultivo masivo de muchas especies de insectos y pueden destruir una colonia completa dependiendo de las especies presentes y de las medidas tomadas para eliminarlos.

Varios factores pueden influir para que se presente este problema, entre ellos el origen de los insectos, los ingredientes utilizados en la dieta, etc.

Aislar e identificar los microorganismos presentes, conocer su fuente de origen y determinar una fuente de control efectiva permitirá optimizar el sistema de cría masiva "*in vitro*" y obtener números suficientes de parasitoides de calidad y a bajo costo para el desarrollo de los programas de liberaciones aumentativas que contribuyan a controlar las plagas agrícolas y a disminuir la contaminación del medio ambiente.

Los dos factores decisivos en la implementación de un programa de cría masiva de insectos "*in vitro*" son: primero, el costo de producción de los ectoparasitoides y segundo, encontrar un sistema ideal de protección contra la contaminación de todo el sistema de cría por microorganismos, por lo que en este estudio se efectuaron pruebas con la finalidad de hacer estas modificaciones y tuvieron como base investigaciones dirigidas a prevenir y controlar la contaminación de las dietas artificiales en sistema de cría.

2. ANTECEDENTES

2.1 Uso de microbicidas para el control de microorganismos.

Los parasitoides que han resultado ser más efectivos para el control de *Anthonomus grandis* Boheman son *Bracon mellitor* Say Himenóptera: Braconidae y *Catolaccus grandis* Burks Himenóptera: Pteromalidae. Pruebas de laboratorio y de campo de cría masiva y liberaciones aumentativas realizadas por King y col. (1995) llevadas a cabo en el Valle del Bajo Rio Grande, Texas y otras localidades de los Estados Unidos. Summy y col. (1992,1994) han demostrado la capacidad de *C. grandis* para parasitar al picudo del algodón. En pruebas de campo en Brasil, *C. grandis* resultó ser el más eficiente para controlar a este picudo (Avelino y col, 1993); sin embargo, el uso de parasitoides está limitado por el alto costo de producción en masa y por los problemas tanto técnicos como económicos asociados con la cría "in vivo" del insecto plaga y del parasitoide (Nettles, 1990).

Singh y House, (1970) revisaron los efectos de varios agentes microbicidas en dietas para insectos y comprobaron que causaban diversas alteraciones en el desarrollo larval y aumentaban la tasa de mortalidad. Singh y Bucher, (1971) reportaron los efectos de varios antimicrobiales mezclados con dietas sintéticas en el desarrollo de *Agria housei* y describieron los daños causados a los insectos principalmente en el crecimiento y tiempo de desarrollo. Sikorowsky y col. (1980), utilizaron mezclas de antimicrobianos y arena u olote triturado en la superficie del medio de cultivo del picudo del algodón para determinar su efectividad en el control de microorganismos contaminantes y reportaron que además de efectivos para el control de los microorganismos contaminantes no afectaron el desarrollo, producción de huevecillos, eclosión y producción de feromona.

De los químicos conocidos que tienen capacidad de eliminar microorganismos, los más comunes son compuestos de cloro y sales cuaternarias de amonio. El cloro es

efectivo contra un amplio rango de bacterias, hongos y algunos virus; los compuestos de amonio son fuertemente bactericidas. Martignoni y Milstead (1960), probaron dos compuestos de sales cuaternarias de amonio y reportaron que tenían buena actividad bactericida y baja toxicidad a mamíferos.

Entre los fungicidas conocidos y menos tóxicos a insectos se encuentran los ditiocarbamatos y bencimidazoles. Los ditiocarbamatos son considerados poco específicos (Lyr, 1977), el grado de acción de estos productos es multifacético, por lo cual el hongo no desarrolla resistencia. El benomil ha sido reportado como inhibidor del desarrollo de diferentes especies de hongos, principalmente de los que se utilizan como agentes de control biológico aún en dosis ultrabajas (Horton y col, 1980) pero no existen reportes sobre su efecto en otros grupos de hongos (Majchrowicz y Poprawsky, 1993), y variaciones en la sensibilidad "*in vitro*" de diferentes cepas de la misma especie de hongo han sido reportadas por Olmert y Kenneth (1974). Giffawasen y col (1977), probaron diversas sustancias fungicidas para el control de *A. niger* y encontraron que una cepa de este hongo era resistente a metilparabenzoato. Ludeman y col. (1979), al probar otros fungicidas, incluyendo benomil, contra cepas de *Aspergillus spp* resistentes, encontraron que algunos eran efectivos, inhibiendo el crecimiento hasta por 14 días.

2.2 Estimación de pérdidas.

Más de 100 especies de insectos y ácaros son plaga del algodonero en los Estados Unidos de Norteamérica (Cross y Chestnut, 1968; King y col. 1995). De 1980 a 1987, el daño atribuido a esos insectos y ácaros, a pesar de los esfuerzos para controlarlos fue de 7.14%. En 1993, las plagas de artrópodos redujeron la producción de algodón en Estados Unidos de Norteamérica en 7% y se produjo la pérdida de 890,000 pacas y 331'000,000 U. S. Dlls. en ingresos. Además, se invirtieron 586'000,000 de dólares en insecticidas para controlar las plagas. Así, el costo para controlar plagas fue de 917'000,000 de dólares en 1993. Esto no incluye el altísimo costo de la degradación ambiental causada por la aplicación de 1.6 libras (ingrediente activo) de insecticidas

químicos sintéticos por hectárea de algodón por año (King y col, 1995). Se considera que la mitad de las pérdidas en la producción de algodón en 1993 se debió a tres especies de plagas, destacando principalmente el picudo del algodnero.

En México, el cultivo del algodnero es de gran importancia socioeconómica por la superficie de siembra, las divisas que genera y otros productos que se obtienen, por ejemplo aceites de su semilla y otros subproductos para alimentación animal. En 1981 se sembraron en el territorio nacional 370,000 hectáreas en diversas zonas algodneras del país, con una producción de 1'600,000 pacas .(INIA, 1981). En 1995, la superficie sembrada de algodón a nivel nacional fue de 165,000 hectáreas. La mayor superficie sembrada y cosechada en el periodo primavera-verano fue en Sonora. En el ciclo otoño invierno, la mayor superficie sembrada fue en Sinaloa. La producción anual fue de 535,000 toneladas con pérdidas aproximadas del 10% (SAGAR, 1995).

En el territorio nacional, en 1981 se sembraron 85,000.00 hectáreas de chile con una producción de 500,000 toneladas de todas las variedades, de las cuales se exportó aproximadamente el 10%. En 1995, se reportó una producción de 782,000 toneladas a nivel nacional de una superficie sembrada de 68,280 hectáreas. Los principales problemas que se presentaron fueron causados por *Phytophthora capsici* y por *Anthonomus eugenii*, de lo cual resultaron pérdidas de aproximadamente 7% (SAGAR,1995).

2.3 Biología y hábitos de *Anthonomus grandis*.

Anthonomus grandis es considerado como una de las plagas más destructivas en el cultivo del algodnero. Se encuentra distribuido en todas las zonas algodneras de México, a excepción de Mexicali, B. C. En la comarca lagunera solo se encuentra en algunos municipios esporádicamente y en algunas zonas de Chihuahua pocas veces causa daños de importancia (Bayer, 1986).

Los adultos del insecto son de un tamaño promedio de 6mm de largo, con una probóscide que mide aproximadamente la mitad de la longitud del cuerpo. Las alas superiores son endurecidas y con estrías longitudinales. La característica más distintiva de la especie son las dos espinas que tiene en los fémures delanteros. Son de color café rojizo - amarillento, obscureciéndose al transcurso de los días de emergido el adulto (SAGAR,1995).

Los insectos adultos pasan el invierno en plantas y arbustos silvestres, residuos de cosecha y en general en lugares bien protegidos, en la primavera se vuelven activos y las hembras fecundadas quedan listas para ovipositar, mientras que los machos se alimentan de las yemas terminales, botones florales y flores. Posteriormente, las hembras fecundadas hacen una perforación con su pico en los botones florales y ponen un solo huevecillo en cada perforación tapándola con una secreción pegajosa. Estos lugares son notorios porque se observa una pequeña protuberancia. Cada hembra puede ovipositar de 100 a 300 huevecillos. Después de la incubación, emergen pequeñas larvitas que empiezan a comer el interior de las bellotas, provocando posteriormente la caída de las mismas.

El desarrollo larvario lo efectúan en el interior de la parte atacada presentando tres estadios larvales siendo las larvas ápodas, curvadas y de color blanquecino, de 12 mm de longitud, se transforman en pupas y posteriormente en el adulto que sale al exterior. Todo el ciclo biológico se completa en un promedio de 15 a 20 días, pero en climas muy cálidos y húmedos puede ser más corto (SAGAR, 1995).

2.3.1 Biología y hábitos de *A. eugenii*.

El picudo del chile *A. eugenii* se alimenta en pocas especies de plantas. *A. eugenii* es considerado una plaga importante de especies de *Capsicum* en el sureste de Estados Unidos de Norteamérica, Centroamérica, Hawai e islas del Caribe. El adulto es de color negro, café o grisáceo con un promedio de longitud de 0.3 cm , con una espina fuerte en la mitad del fémur anterior; se alimenta de yemas y frutos y las hembras ovipositan en

botones florales y frutos. Las larvas son ápodas con cabeza café, miden menos de 0.6 cm de largo. Se encuentran formando túneles en la masa de semillas en el centro de los chiles donde se alimentan, lo cual ocasiona la caída prematura del fruto y causa pérdidas que superan el 50% de la cosecha. *A. eugenii* presenta tres estadios larvales y múltiples generaciones por año. No ha sido reportada la diapausa en este picudo; lo cual indica que su rango está limitado a áreas con plantas hospederas del picudo que puedan albergarlo durante el invierno (Bayer, 1986).

2.3.2 Biología Ecología y Comportamiento de Insectos Parasitoides

Existe gran diversidad de relaciones entre los parasitoides y su hospedero desde el punto de vista ecológico y biológico (Thompson, 1986).

Los himenópteros son parásitos en los cuales las etapas inmaduras o juveniles son parásitas de otros insectos o artrópodos, mientras que la etapa reproductiva adulta es de vida libre y se alimenta de miecillas, néctares o desechos orgánicos de origen animal o vegetal. Sin embargo existen muchas especies parasíticas que deben alimentarse de los hospederos para poder producir huevecillos (Vinson, 1976).

Los parasitoides presentan numerosas adaptaciones biológicas, morfológicas y de comportamiento que los distinguen tanto de las especies depredadoras como de las fitófagas. Parasitoide es el término que se utiliza en la literatura entomológica para referirse a los insectos que parasitan a otros artrópodos y que generalmente atacan grupos de la misma categoría taxonómica o similar; sólo los estadios inmaduros tienen hábitos parasíticos, la diferencia de tamaño entre el parasitoide y su hospedero no es muy pronunciada y generalmente matan al hospedero al finalizar el desarrollo inmaduro o antes (Vinson, 1976).

A los parasitoides que se desarrollan en el exterior del hospedero se les denomina ectoparásitos. Con frecuencia, las hembras de las especies ectoparasíticas paralizan temporal o permanentemente a sus hospederos.

La forma de reproducción puede ser: teliotocas o exclusivamente partenogenéticas, produce sólo hembras; deuterotocas, partenogenéticas, puede producir machos; o arrenotocas facultativamente partenogenéticas. La oviposición y el desarrollo de los parasitoides puede iniciarse desde la etapa de huevecillo del hospedero. Por ejemplo, las especies de *Trichogramma* son parasitoides de huevecillos, las especies de Bracónidae lo son de huevecillo-larva, huevecillo-ninfa o de adulto; las de Pteromalidae de larva, las de Ichneumonidae lo son de pupa.

El proceso de selección se lleva a cabo cuando hospedero y parasitoide coinciden temporal y espacialmente. La forma de localización es por medio de estímulos físicos y químicos (semioquímicos). La orientación se efectúa por medio de fotorreceptores, mecanorreceptores o quimiorreceptores. La regulación de la fisiología del hospedero se inicia al momento de la oviposición, cuando la hembra inyecta sustancias tóxicas para paralizar al hospedero al que modifican su ritmo normal de desarrollo. Esto permite que el ectoparasitoide aproveche al máximo los recursos nutricionales disponibles. (Thompson, 1985; Garza y Guerra 1992).

2.4 Hospederos

El picudo del algodón evoluciona de *Hampea spp.*, su hospedero ancestral en Centroamérica (Burke y col., 1986). La colonización subsecuente del algodón silvestre seguido del cultivo del algodón en la costa este y tierras bajas de México proporcionó un puente al Valle Bajo del Río Grande y su expansión al norte, apoyado por la habilidad de sobrevivir el invierno en diapausa facultativa, le permitió escapar a sus enemigos naturales que habían coevolucionado con él. Los parásitos nativos del picudo del algodón tienen un amplio rango de especificidad y por lo tanto no responden a las

dinámicas de población como lo haría un parásito más específico. Por ejemplo, *Bracon mellitor* aparece muy tarde en la temporada de cosecha como para mantener al picudo a niveles abajo del umbral económico. Algunos parásitos que atacan al picudo del algodón y a la especie relacionada *A. hunterii* (Burks y Cate) en el sureste de México incluye *Catolaccus grandis* (Burks) *C. hunteri* (Crawford), *Heterosphilus annulatus* (Marsh), *H. megalopus* (Marsh), *Bracon compressitarsis*, *Urosigalphus schuarzi* (Gibson), *Zatropis incertus* (Ashmead), *Lelaps sp.*, *Paracrias anthonomi* (Woolley y Shauff), *Nealiolus sp.*, *Phaneronoma sp.*, y *Spilochalcis sp.*, (Cate y col. 1990). Algunas de estas especies han sido cultivadas en el laboratorio.

2.5 Cría de insectos.

La cría de insectos ha sido la base para el descubrimiento y desarrollo de agentes de control biológico. Ahora la tecnología ofrece nuevas herramientas para el descubrimiento e implementación de métodos de control de insectos. Los cultivos masivos de insectos juegan un papel preponderante en ese desarrollo y reflejan los cambios relacionados con las interfases físicas, químicas y biológicas entre el insecto y su agente de control (Shapiro, 1986 Yazlovetsky, 1986).

El desarrollo de tecnologías efectivas y económicamente factibles para cultivo masivo de insectos es una meta a lograr para el éxito de programas de biocontrol (Thompson, 1986). Shapiro (1986), asevera que a medida que se desarrollen nuevos agentes de control, el énfasis en investigación cambiará y en vez de usar compuestos orgánicos sintetizados y formulados por químicos se utilizarán productos orgánicos naturales sintetizados por organismos y formulados como componentes de esos mismos organismos. King y Powell (1992), señalan que se ha dado considerable atención al desarrollo de técnicas para producir insectos de calidad en grandes números y que la comercialización puede ser práctica solo para organismos seleccionados para los cuales se han desarrollado dietas adecuadas. El cultivo artificial es el adelanto que permitirá la ampliación del uso de las técnicas de aumento para el control de plagas.

El uso de dietas artificiales en programas de propagación masiva está limitado a pocas especies de depredadores y parasitoides.(Thompson, 1975). Aunque existen considerables avances en cultivo *in vivo*, no se han logrado en la misma medida en el cultivo *in vitro* (Thompson, 1986), debido a las complejas interacciones entre hospedero y parasitoide, especialmente en el caso de endoparasitoides que están altamente especializados y adaptados a su hospedero.

De acuerdo a King y Hartley (1992), se han logrado avances en el cultivo *in vitro* de varios parasitoides, pero un sistema factible no ha sido desarrollado todavía, para cuando menos 22 especies de entomófagos que han sido cultivados *in vitro*, entre ellas, varias especies de himenópteros y dípteros.

Los programas de liberaciones masivas para el control del picudo del algodónero y otras plagas que afectan a cultivos de importancia económica son prometedores, sin embargo, una limitante importante es el alto costo de la propagación masiva *in vivo* que requiere de la producción de insectos hospederos (Leppla y Guerra, 1989; Cate, 1987; Nettles, 1990). Una forma menos costosa es la producción masiva *in vitro*. Guerra, (1992), reportó por primera vez que *B. mellitor* y *C. grandis* podían ser cultivados *in vitro* en dietas artificiales preparadas con hemolinfa de distintos insectos, sin embargo, estas dietas tenían el inconveniente de ser caras y producían porcentajes bajos de insectos adultos. Guerra y col. (1993), cultivaron con éxito *B. mellitor* y *C. grandis in vitro* en una dieta artificial mejorada y sin componentes de insectos con la cual se obtuvieron poblaciones normales de adultos con capacidad de reproducirse.

2.6 Materiales utilizados para cría.

La nutrición en insectos involucra muchos procesos metabólicos, fenómenos fisiológicos y ecológicos asociados con la selección natural que determinan cuáles son los nutrientes esenciales para cada especie (House, 1961).

Las dietas artificiales y el sistema de propagación *in vitro* facilitan enormemente el camino hacia la propagación masiva y hacen económicamente factible la cría de parásitos con calidad garantizada de acuerdo a King (1993). Hasta la fecha, ningún parásito evaluado ha tenido éxito para realizar el control biológico del picudo del algodnero y en la historia del control biológico ningun parásito de larvas se había usado para controlar esta plaga. La cría masiva de insectos es el primer paso para estudiarlos ya que se necesitan grandes números para sustentar las investigaciones de su biología, fisiología y comportamiento. Mucho de su metabolismo, nutrición y comportamiento no ha sido aún dilucidado o se conoce sólo en algunos grupos de insectos (King, 1993).

Dietas de composición química conocida han sido formuladas para cría de ectoparasitoides. Thompson (1986), desarrolló una dieta que contenía 6% de proteína en una mezcla de 19 aminoácidos; 2% de carbohidratos, principalmente D-Glucosa; 0.25% de lípidos incluido colesterol y ácidos grasos y 0.25% de vitaminas, complejo B e inositol además de 0.5% de sales inorgánicas y logró cultivar con éxito ectoparasitoides del género Ichneumonidae.

Guerra y Garza (1978), sustituyeron la caseína, harina de soya y germen de trigo utilizados como proteína estándar en dietas para *Heliothis zea* y *H. virescens* por el alga *Spirulina* y encontraron que además de ser considerablemente más económica, el ciclo biológico y de reproducción fueron comparables con los obtenidos cuando se utilizaba la dieta estándar.

2.7 Entomopatógenos importantes.

2.7.1 Virus.

Los virus los cuales son patógenos a insectos se pueden catalogar en dos grupos: Los que poseen inclusiones (pueden verse al microscopio de luz) y los que no las poseen (visibles sólo al microscopio electrónico).

Los virus entomopatógenos generalmente afectan a insectos vía digestiva, provocándoles infecciones agudas o crónicas que afectan a un tejido específico o a todo un sistema.

La vía de entrada común de los virus entomopatógenos es por ingestión de alimento contaminado. Otras vías posibles de transmisión son a través del huevecillo contaminado, transovárica o por parasitoides (Hukuhara, 1985).

Las cuatro familias más importantes como entomopatógenos son: Poxviridae, Reoviridae, Iridoviridae y Baculoviridae. Los correspondientes a ésta última son específicos de invertebrados y presentan alta especificidad; entre ellos se encuentran los virus de la poliedrosis nuclear y de la granulosis que son utilizados en gran escala en el control biológico.

2.7.2 Bacterias.

Las características de las bacterias hacen que sean el tipo de microorganismos más abundantes asociado con insectos, ya sea interna o externamente y actuando como simbioses, saprófitas o patógenas. Los dos tipos de bacterias capaces de causar enfermedad en insectos son las patógenas que causan infección si son ingeridas y las potencialmente patógenas u "oportunistas" que están ampliamente distribuidas y que pueden causar infección cuando el insecto está debilitado o en condiciones de tensión.

Entre las bacterias patógenas se puede mencionar a especies de *Bacillus*, principalmente *B. thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia marcescens* entre otras. *Enterobacter*, *Proteus* y *Staphylococcus* son consideradas potencialmente patógenas.

2.7.3 Hongos.

Los hongos son los patógenos más frecuentes de insectos, esto probablemente se debe a su amplia distribución. Los hongos entomopatógenos afectan a una gran variedad de insectos acuáticos y terrestres lo mismo que a otros invertebrados y vertebrados. Aunque los hongos son los causantes de algunas de las primeras enfermedades conocidas en insectos (Poinar y Thomas, 1978) aún están inconclusos los estudios básicos de la mayoría de estos hongos.

La mayoría de los hongos patógenos inician la infección por medio de esporas que penetran la cutícula del insecto y se ramifican al hemocele. Algunos hongos son específicos de hospedero o de etapa del insecto, mientras otros tienen amplio rango de hospederos.

Las infecciones por hongos dependen principalmente de las condiciones de temperatura y humedad y de la presencia de grandes poblaciones. Entre los hongos entomopatógenos más importantes se encuentran *Beauveria bassiana*, *Metarrhizium anisopliae* y *Paecilomyces spp.* Otros más específicos son *Entomophthora spp.*, *Massospora spp.*, *Aspergillus flavus* y *A. ochraceus* (Poinar y Thomas, 1978).

3. OBJETIVOS

De acuerdo a lo anterior se plantearon los siguientes objetivos.

- Diseñar la metodología más adecuada para aislar e identificar microorganismos en dietas artificiales experimentales, cámaras y cuartos de cría del insectario y cámaras bioclimáticas así como insectos criados en las condiciones estándar.
- Identificar la flora microbiana presente en el sistema de cría de *Catolaccus grandis* con la finalidad de tomar las medidas necesarias para el control de dichos microorganismos.
- Determinar el patrón de susceptibilidad a diversos antimicrobianos de las bacterias y hongos aislados.
- Evaluar microbicidas en la dieta y en el sistema de cría masiva (equipo y materiales) para determinar cuáles podían prevenir la contaminación en la dieta y en el sistema de cría sin afectar el ciclo vital de los parasitoides.
- Evaluar diversos materiales y sustancias utilizados en las cámaras de cría para reducir costos de producción al sustituirlos por otros de mayor costo que se utilizan actualmente.

4. HIPOTESIS

Como actualmente los programas de liberaciones masivas resultan incosteables se postuló que: Al reducir la contaminación del material biológico y modificar algunos materiales en el sistema de cría sería económicamente posible desarrollar un programa regional de cría masiva a base de liberaciones aumentativas de ectoparasitoides para el control del picudo del algodón y/o del picudo del chile en áreas extensas donde se presentan estas plagas.

Una modificación apropiada en los materiales de cría y la dieta artificial así como un programa de sanidad para prevenir la contaminación microbiana en el insectario resultaría en una reducción en el costo de producción y en la implementación práctica y económicamente factible de un programa de aumento de estos parasitoides.

5. MATERIAL Y METODOS

Esta investigación se realizó en las Facultades de Agronomía y Ciencias Biológicas de la UANL, y en la Unidad de Investigaciones para el Control Biológico de Plagas, del Laboratorio de Investigaciones Agrícolas Subtropicales del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en Weslaco, TX. como parte de un convenio cooperativo entre ambas instituciones.

El material biológico utilizado en el presente estudio se obtuvo de poblaciones de picudo del algodónero criado en dieta artificial meridica y de poblaciones de *Catolaccus grandis* criadas "in vivo" sobre larvas de 3er. estadio de picudo del algodónero usando celdas de parafilm (Cate, 1987), y las condiciones de cría descritas por Guerra (1992), ambas cultivadas en el insectario de la Unidad de Control Biológico del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en Weslaco TX.

5.1 Pruebas microbiológicas

En este estudio se determinó el origen y tipo de posibles microorganismos contaminantes mediante muestreos para análisis microbiológico en diferentes sitios del sistema de cría de *C. grandis*, en material biológico, dietas y medio ambiente. Cada una de las muestras se sembró en diferentes medios de cultivo para aislamiento, los cuales favorecen el crecimiento de cualquier tipo de microorganismo por contener todos los constituyentes esenciales para su desarrollo. Se hicieron resiembras para obtener cultivos puros de cada una de las bacterias aisladas y posteriormente se identificaron los microorganismos mediante siembra en medios diferenciales, los cuales consisten en medio de cultivo básico con ciertos reactivos o compuestos químicos adicionados con la finalidad de diferenciar las bacterias en base a sus características, morfología por medio de observaciones al microscopio, tinción y pruebas bioquímicas.

5.2 Sitios de Muestreo

Los sitios de muestreo fueron los siguientes:

5.2.1 Material Biológico: adultos de parasitoides vivos, adultos de parasitoides muertos, larvas vivas de 3er. estadio de picudo, lavado de larvas vivas de 3er. estadio de picudo.

5.2.2 Medios de Cultivo: Dieta estándar del picudo, dieta estándar del parasitoide, dietas estándar contaminadas que sirvieron de medio de cultivo a larvas de picudo y dietas estándar contaminadas que sirvieron de medio de cultivo a larvas de *C. grandis* por 6 y 12 días.

5.2.3 Materiales del Sistema de cría: Cubierta de parafilm limpias y usadas en cámaras de cría para parasitoides y picudos, cubiertas de parafilm tratadas con hexano (estimulante de oviposición reportado por Guerra y col.,1994) interior de jaulas de cría, cámara de emergencia de adultos, puertas, pisos, paredes y mesas en cuartos de cría, muestras de aire obtenidas en cuartos del insectario usados para la cría de picudos y parasitoides.

5.3 Metodología

Se colectaron muestras de los puntos seleccionados del sistema de cría masiva de *C. grandis* (Figura 1) mediante el uso de hisopos estériles. Para las muestras de aire obtenidas del medio ambiente del cuarto de cría y del medio ambiente de laboratorio se utilizó una bomba de vacío por espacio de 30 min (Figura 2). Las muestras se sembraron en tubos conteniendo 2 ml de caldo caseína de soya (CCS) y se incubaron a 35°C/24h. A partir de cada tubo se sembró con asa bacteriológica por estría cruzada (Figura 3) en placas Petri conteniendo agar caseína de soya (ACS), agar MacConkey (AMC) y agar

papa dextrosa (APD). Se incubaron a 35°C/24h., con excepción de las muestras sembradas en APD que se incubaron a 28 ±2°C/5 días.

5.3.1 Aislamiento de bacterias y hongos.

5.3.1.1 Bacterias.- Se siguieron las técnicas de Cowan y Steel (1982), Edwards y Edwin (1972), Finegold y Martin (1983) y Krieg y Hold (1984). Para confirmar la identificación de algunas cepas se realizaron pruebas rápidas API 20E y NFT (Merck).

5.3.1.2 Hongos.- Utilizando hisopos estériles se sembró de cada sitio de muestreo en APD y se incubaron a 28-30°C durante 5 días. De las colonias aisladas se resembró en el mismo medio de cultivo en tubos inclinados y se incubaron por 5 a 10 días. Para la identificación de los hongos aislados en base a su morfología se hicieron observaciones directas al microscopio y de preparaciones hechas con lactofenol-azul de algodón (Figura 4). Se hicieron microcultivos para ayudar a la identificación (Henrici, 1946 según Verna y Herrero 1952) (Figura 5). La especie se determinó utilizando claves sistemáticas (Rapper y Fennell, 1977; Barnett y Hunter, 1982).

5.4 Identificación de bacterias

Se utilizaron los métodos tradicionales (morfología, tinción de Gram y pruebas bioquímicas), y el sistema API-20E y API-NFT (Merck).

A partir de cultivos puros de 24h. de incubación se hicieron frotis, se fijaron al calor y se tiñeron con la técnica de Gram. A los bacilos cortos Gram (-) se les hizo la prueba de oxidasa (utilizando clorhidrato de tetra-metil fenilén-diamina) y en base a los resultados obtenidos de esta prueba se seleccionaron las pruebas bioquímicas que se realizarían.

A las cepas oxidasa positivas se les determinó motilidad, producción de pigmento, oxidación-fermentación de glucosa y maltosa, utilización de citratos como única fuente de carbono, producción de indol, producción de ácido sulfhídrico, acetil metil carbinol, crecimiento a 4°C y a 42°C, acción sobre diferentes carbohidratos y descarboxilación de la ornitina.

A las cepas oxidasa negativas se les determinó motilidad, rojo de metilo, producción de indol, producción de ácido sulfhídrico, acetil metil carbinol, utilización de citrato como única fuente de carbono, hidrólisis de la urea, descarboxilación de la lisina y ornitina, desaminación de la fenil alanina y oxidación-fermentación de la glucosa. Se utilizaron los sistemas API-20E y API-NFT (Merck) para corroborar los resultados.

5.5 Pruebas de Sensibilidad

Entre los grupos de bacterias que presentan patrones variables de susceptibilidad se encuentran las enterobacterias, bacilos Gram (-) no fermentadores. Las pruebas de susceptibilidad "*in vitro*" pueden ser cuantitativas (se mide la mínima concentración capaz de inhibir el desarrollo de las bacterias) o semicuantitativas (las cepas se clasifican en resistentes o susceptibles).

Para determinar el patrón de susceptibilidad de las bacterias aisladas del sistema de cría masiva de *C. grandis* a diversos agentes antimicrobianos (impregnados en sensidiscos), se realizaron pruebas de sensibilidad "*in vitro*" semicuantitativas con la finalidad de tomar medidas efectivas para su control. A partir de cada cepa bacteriana se inocularon 5 ml de caldo soya tripticasa (CST), se incubaron a 35°C durante 2 a 5 h. y se ajustó la turbidez al tubo 2 del nefelómetro de MacFarland. Se humedeció un hisopo de algodón estéril en la suspensión, se quitó el exceso presionando y girando el hisopo sobre la pared interna del tubo y se sembró sobre la superficie del agar (AST) para obtener un inóculo uniforme. Después de 3 a 5 minutos para permitir el secado del

inóculo se tomaron los sensidiscos con pinzas estériles y se colocaron presionando ligeramente para asegurar el contacto con la superficie.

Las cajas petri se invirtieron después de 15 minutos de haber colocado los sensidiscos y se incubaron a 35°C durante 16 a 18 horas.

La medición de los halos de inhibición se hizo con la plantilla diseñada para este propósito según el fabricante y se clasificaron las cepas en resistentes (R), intermedias (I), o susceptibles (S) dependiendo del diámetro del halo de inhibición. El procedimiento se repitió para cada una de las 23 cepas obtenidas de 21 sitios del sistema de cría masiva de *Catolaccus grandis*. La simbología de los antimicrobianos utilizados es la siguiente: 1.- SXT= Trimetoprim; 2.-AK= Amikacina; 3.- AM= Ampicilina; 4.- CB=Carbencilina; 5.- CF= Cefalotina; 6.-CTX= Cefotaxima; 7.- CRO = Ceftriaxona; 8.- CL= Cloranfenicol; 9.- GE= Gentamicina; 10.- NET = Netilmicina; 11.- NF = Nitrofurantoina; 12.- PEF= Pefloxacina.

5.6 Contaminación de huevecillos

Uno de los factores limitantes que influye negativamente en los sistemas de cultivo masivo "*in vitro*" de parasitoides es la presencia de contaminantes en los huevecillos que se implantan sobre la dieta.

Con el objeto de prevenir la contaminación de larvas recién emergidas de parasitoides, durante este estudio se desarrolló una técnica para la desinfección superficial de los huevecillos de *C. grandis*. En estas pruebas se evaluaron cuatro sustancias desinfectantes que se probaron en tres tiempos de contacto y cuatro concentraciones diferentes. Las sustancias utilizadas fueron: iodo al 0.63%, 1.25%, 2.0%, y 2.5%; sulfato de cobre al 2, 4, 8, y 16%; hipoclorito de sodio al 0.5, 0.75, 1.0 y 2% y etanol al 50, 60, 70 y 80% considerandose como muy baja, baja, media y alta. Los tiempos de contacto a estas sustancias fueron 60, 120 y 180 segundos. Los huevecillos se lavaron

individualmente en cada sustancia, concentración y tiempo seleccionados, Se utilizaron cajas multiwell de 24 orificios, en cada orificio que contenía 0.5 ml de la dieta estandar se colocó un huevecillo y se consideró como la unidad experimental. Se hicieron 48 repeticiones para cada combinación y en estas pruebas se determinó el efecto de las concentraciones de estas sustancias sobre los microorganismos contaminantes, daño a los huevecillos , eclosión y desarrollo larval subsecuente.

5.7 Evaluación de conservadores adicionados a la dieta estándar del parasitoide.

Se sustituyeron los microbicidas presentes en la dieta estándar para *C. grandis* (Guerra y col. 1993) por las siguientes mezclas de conservadores: benzoato de sodio 0.01% - propionato de sodio 0.032% (dieta 1) y sorbato de potasio 0.032% - propionato de sodio 0.032% (dieta 2). Dichas dietas fueron administradas a parasitoides provenientes de huevecillos no tratados y tratados con yodo, NaClO₃, CuSO₄ y etanol, donde *C. grandis* provenientes de huevecillos no tratados con yodo que fueron alimentados con la dieta estandar se consideraron como testigo. La evaluación del efecto de los conservadores se determinó después de incubar los huevecillos a 28°C durante 14-16 días, tiempo necesario para que se llevara a cabo el ciclo completo del parasitoide. La evaluación comprendió la observación de la eclosión de los huevecillos, la emergencia de adultos y la cuenta de bacterias y hongos en la dieta. Para cada tratamiento se utilizaron dos cajas multiwell con 24 pozos cada una . En cada orificio que contenía 0.5 ml. de dieta estandar en un extremo se implantó un huevecillo en la porción seca del orificio y se consideró como la unidad experimental, obteniéndose un total de 48 repeticiones por mezcla.

5.8 Evaluación de varios microbicidas para el control de microorganismos aislados del sistema de cría de *C. grandis*.

El material biológico utilizado en este estudio consistió en 13 cepas de bacterias (*Pseudomonas fluorescens*, 3 cepas, *P. aeruginosa*. 1 cepa, *Citrobacter freundii*, 3 cepas, *Enterobacter agglomerans*, 3 cepas, *Aeromonas hydrophila*, 2 cepas, *Salmonella* sp. 1

cepa) y 4 cepas de hongos (*Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium sp.* y *Rhizopus sp.*) aisladas e identificadas del sistema de cría masiva de *C. grandis* con las cuales se realizaron pruebas "in vitro" utilizando dos desinfectantes: dióxido de cloro y sales cuaternarias de amonio y dos fungicidas: benomil y mancozeb; los primeros se probaron contra bacterias y hongos y los últimos sobre hongos solamente.

5.8.1 Acción bactericida del ClO₂ y de las sales cuaternarias de amonio

Para conocer la acción germicida del dióxido de cloro y de las sales cuaternarias de amonio sobre las bacterias aisladas del sistema de cría masiva de *C. grandis*, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de dichas sustancias en tres tiempos: 1, 5 y 10 min. respectivamente. se probaron concentraciones desde 25 hasta 1000 ppm para el dióxido de cloro y de 10 a 450 ppm para las sales cuaternarias de amonio. Todas las pruebas se corrieron a 28°C y la temperatura de incubación fué de 35°C.

5.8.1.1 Preparación de las diluciones para los tubos de prueba .

Se prepararon diluciones de ClO₂ de 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 700, 800, 900 y 1000 ppm. Se realizaron pruebas con 13 cepas aisladas en el sistema de cría de *C. grandis*. Las cepas probadas fueron de las siguientes bacterias: *Psuedomonas flourescens*, *P aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans*, *Aeromonas hydrophila* y *Salmonella sp.* Para cada concentración y cepa se utilizó una dilución de la bacteria en solución amortiguadora y se ajustó al tubo 1 del nefelómetro.(Figura 8). Se tomaron 0.2 ml. de la dilución y se colocaron en un tubo con 5 ml. de la concentración a probar . Al término de cada tiempo (1, 5, 10 min.) se tomó una gota con asa bacteriológica y se sembró en tubos conteniendo 2 ml. de CST. Se efectuaron tres repeticiones y se incubaron a 35°C durante 24h. observándose posteriormente para determinar su turbidez. La turbidez es indicativa de crecimiento

bacteriano y la prueba se considera positiva. La ausencia de turbidez indica que no hubo crecimiento bacteriano por lo que se considera negativa (el tratamiento fue efectivo).

5.8.1.2 Efecto “*in vitro*” de cuatro sustancias fungicidas en el crecimiento de hongos encontrados en el sistema de cría masiva de *C. grandis*.

Para determinar la capacidad de controlar hongos contaminantes aislados del sistema de cría masiva de *C. grandis* se utilizaron 4 sustancias, 2 desinfectantes: dióxido de cloro y sales cuaternarias de amonio y dos fungicidas: benomil (benzimidazol carbamato) y mancozeb (etilen-bis-ditiocarbamato+oxicloruro de cobre). Se preparó una solución patrón de cada sustancia y se hicieron diluciones para obtener las 3 concentraciones utilizadas: 100, 200 y 300 ppm. Los fungicidas se utilizaron a la concentración recomendada por el fabricante y a una dilución 10 veces menor. Las diluciones se hicieron con agua destilada estéril, 5 ml. de cada concentración fueron mezclados completamente con un litro de Sabouraud dextrosa agar (SDA) esterilizado en autoclave y a 45°C y 15 ml. de la mezcla fueron vertidos a cajas petri desechables. Se utilizaron cajas petri con SDA como testigo. El inóculo fresco se obtuvo de cajas petri con SDA que fueron incubadas a 25°C durante dos semanas. Las esporas se colectaron de la superficie de los cultivos por raspado y suspensión de las esporas en agua destilada estéril. La viabilidad de las esporas de cada hongo se determinó de acuerdo al método descrito por Majchrowitz y Poprawsky, (1993), y se cuantificó utilizando una cámara cuentacélulas (fig. 10). La tasa de germinación fué de 95% para todos los hongos probados. Un alicuota de 0.1 ml. de una suspensión acuosa que contenía 500+/- esporas viables fué depositada en el centro de cada caja. Los hongos utilizados en este estudio fueron: *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium sp.* y *Rhizopus sp.* Cada tratamiento fue por cuadruplicado. Los cultivos se incubaron a 28°C +/-2°C durante 14 días y se revisaron a los 3, 5, 7 y 14 días respectivamente. La incubación para cada sustancia se hizo por separado para evitar que productos volátiles de una sustancia pudieran influenciar el crecimiento de los hongos en otro tratamiento o en el testigo.

5.9 Evaluación de materiales para proteger las oviposiciones y coleccionar los huevecillos de los parasitoides

En el sistema de propagación "*in vitro*" de *C. grandis* se utiliza una cubierta de parafilm para proteger las oviposiciones de los parasitoides en las cámaras de cría y al mismo tiempo sirve como artefacto para coleccionar los huevecillos. Con el objeto de aumentar la eficiencia y reducir los costos de producción la membrana de Parafilm que se utiliza en el sistema tradicional para cubrir las cámaras de cría se substituyó por tres tipos de membranas comerciales, una de polietileno para uso en horno de microondas, una de plástico delgado adherible de uso general y finalmente una de papel encerado. La característica en común que tienen estas membranas respecto a la estándar es que son de uso doméstico, de bajo costo y pueden conseguirse fácilmente. Las pruebas consistieron en utilizar las membranas experimentales para cubrir las cámaras de cría de este parasitoide o sea placas Multiwell del tipo utilizado para cultivo de tejidos que contenían la dieta estándar. Las cámaras cubiertas con las diferentes membranas impregnadas con un atrayente de oviposición (Guerra y col. 1994) se introdujeron por separado en jaulas de plástico transparente de 31x41x31cm. Cada cámara contenía aproximadamente 350 hembras grávidas. Transcurridas 4 horas se hizo un recuento total de huevecillos por cámara. En este estudio se utilizó una cámara Multiwell de 24 pozos por tratamiento y cada tratamiento fue repetido 15 veces.

5.10 Análisis de la información

Una vez concluido el trabajo experimental, se organizaron los datos obtenidos de los distintos parámetros evaluados y se procedió a su análisis estadístico. A los resultados obtenidos se les aplicó análisis de varianza, de acuerdo al diseño experimental de bloques al azar y comparación de medias según Tukey.

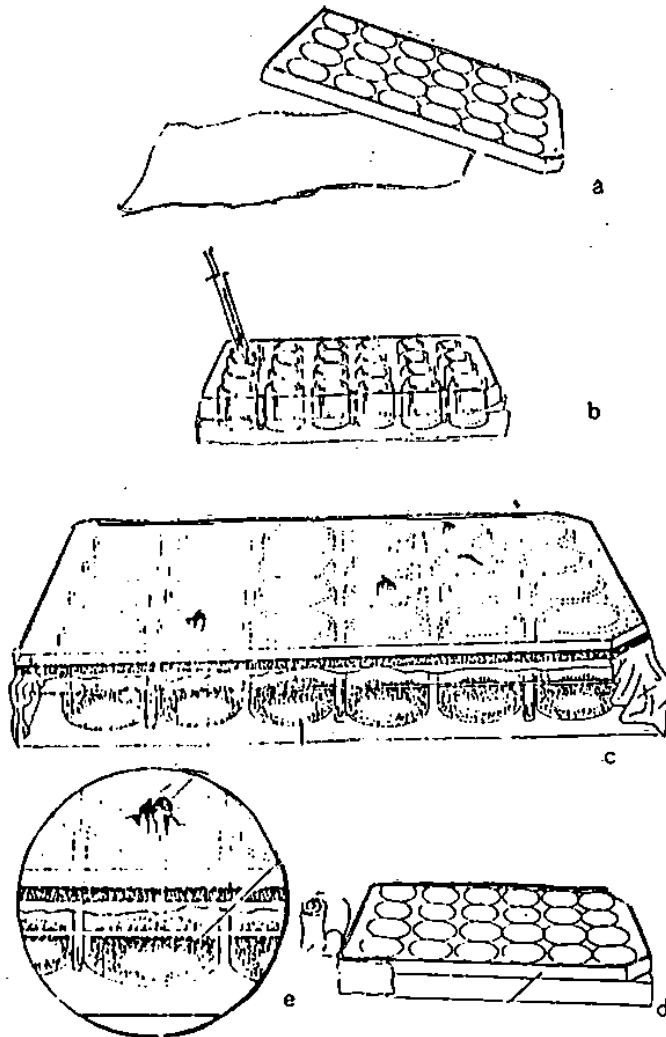


Figura 1. Sistema de cría "in vitro" de *Catolaccus grandis*.

a. tapa removida de la caja multiwell. b. dieta introducida y caja cubierta con hoja de Parafilm. c. aplicación de estimulante de oviposición (en aerosol) sobre la superficie externa del Parafilm. d. caja cubierta con la tapa original y sellada con banda de Parafilm después de eliminar la hoja de Parafilm. e. parasitoide ovipositando.

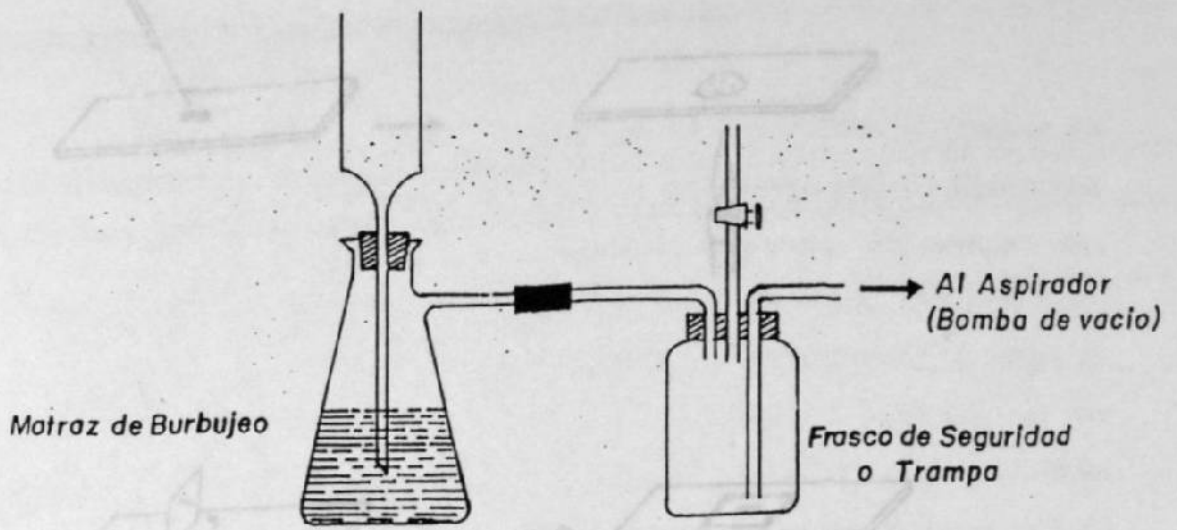


Figura 2. Bomba de vacío.

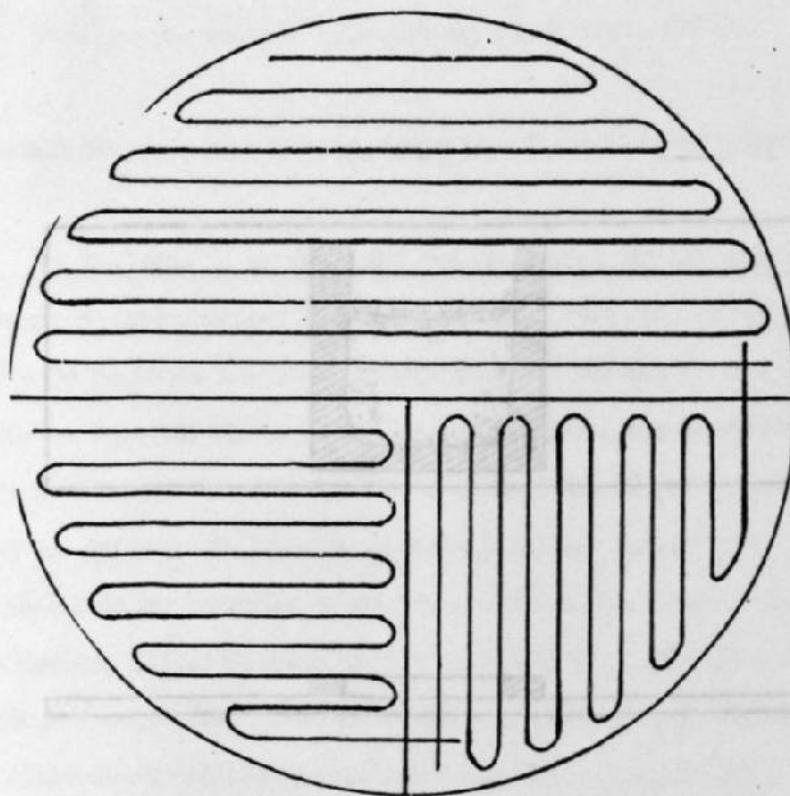


Figura 3. Esquema de siembra por estría cruzada.

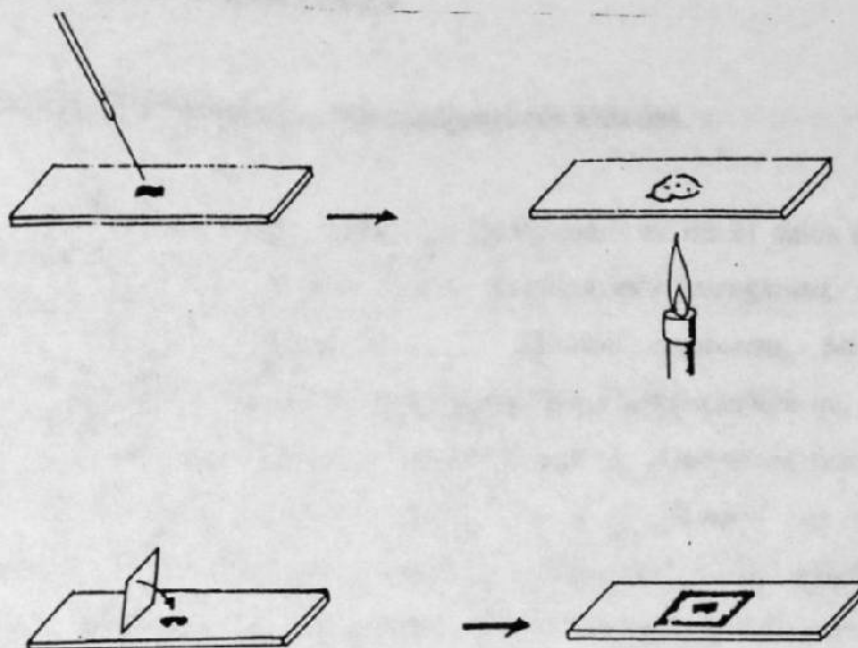


Figura 4. Técnica lactofenol-azul de algodón.

3.2 Sensibilidad de las bacterias aisladas a diversos agentes antimicrobianos

En la Tabla 3 se muestran los resultados de las pruebas de sensibilidad y resistencia de las bacterias a los antibióticos. Para cada uno de los géneros de bacterias aisladas se realizaron pruebas de sensibilidad y resistencia. Se reportan varias especies de bacterias que son sensibles a los antibióticos. La sensibilidad de algunas especies de bacterias aisladas de los sitios de estudio se muestra en la Tabla 3. Los resultados de sensibilidad de las bacterias a los antibióticos se muestran en la Tabla 3. Los resultados de sensibilidad de las bacterias a los antibióticos se muestran en la Tabla 3. Los resultados de sensibilidad de las bacterias a los antibióticos se muestran en la Tabla 3.

Figura 5. Cámara de Henrici.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Pruebas Microbiológicas. Microorganismos aislados.

Las bacterias y hongos aislados e identificados en los 21 sitios de muestreo del sistema de cría de *C. grandis* fueron: *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella sp.*, *Serratia marcesens*, *Micrococcus sp.*, *Enterobacter agglomerans*, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Beauveria bassiana*, *Metharrhizium sp.*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. glaucus*, y *A. ochraceus*. En la tablas 1 y 2 se presenta una relación de los microorganismos identificados y sitios de aislamiento. Varias especies de bacterias aisladas e identificadas en este estudio como *P. aeruginosa* y *Salmonella sp.* son de origen humano, otras especies son potencialmente patógenas a insectos como *Serratia sp.*, lo mismo que algunas especies de hongos como *Beauveria bassiana* y *Metarrhizium sp.*, que han sido reportados como patógenos a insectos e incluso son utilizadas en control biológico con este fin. (Sikorowsky y Lawrence, 1994).

6.2 Sensibilidad de las bacterias aisladas a diversos agentes antimicrobianos

En la Tabla 3 se observan los resultados de las pruebas de sensibilidad y resistencia de las bacterias a los antimicrobianos. Para cada una de las 9 especies de los 8 géneros de bacterias aisladas e identificadas del sistema de cría masiva de *Catolaccus grandis* se reportan varias cepas. La sensibilidad a los antimicrobianos de un mismo género de bacteria obtenido de diferentes sitios fue variable, así como la sensibilidad de diferentes géneros de bacteria obtenidos de un mismo sitio. Los resultados de sensibilidad de las bacterias a los 12 antimicrobianos probados fueron los siguientes: *Pseudomonas* (2/12) en todos los lugares donde se detectó; *Aeromonas* (3/12) en cuarto de cría del parasitoide; *Salmonella* (4/12) en dieta del parasitoide y piso del cuarto de cría; *Enterobacter* (6/12) en medio ambiente del cuarto de cría y *Citrobacter* (7/12) en

TABLA 1. Bacterias aisladas del sistema de cría masiva de *Catolaccus grandis*: (Burks) algunas de las cuales son consideradas patógenas de insectos.

BACTERIAS	Sitio de aislamiento
<i>Aeromonas hydrophila</i> **	Dieta estándar (resiembra) Dieta estándar (seis días) Parasitoides lavados Larvas de picudo lavadas
<i>Citrobacter freundii</i>	Cajas de cría Mangas para manipulación Cámaras de emergencia
<i>Enterobacter agglomerans</i> *	Mangas para manipulación Medio ambiente cuadro de cría Dieta estándar (12 días) Mesas de cría
<i>Micrococcus</i> sp	Larvas de picudo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> **	Cajas de cría Cámaras de emergencia Medio ambiente de laboratorio
<i>P. fluorescens</i> **	Cajas de cría Dieta de picudo
<i>Salmonella</i> sp*	Cuarto de cría Dieta estándar
<i>Serratia marcescens</i> *	Dieta estándar
<i>Flavobacterium</i> sp	Sistema de cría

* Potencialmente patógenas

** Patógena

TABLA 2. Hongos aislados del sistema de cría masiva de *Catolaccus grandis*: (Burks) algunos de los cuales son considerados patógenos de insectos.

HONGOS	Sitio de aislamiento
Aspergillus niger	Medio ambiente de laboratorio
Penicillium sp.*	Medio ambiente de laboratorio
Aspergillus glaucus	Dieta estándar
A. flavus*	Dieta estándar
A. ochraceus**	Dieta estándar
Rhizopus sp.*	Dieta estándar
Metarrhizium sp.**	Dieta del picudo
Beauveria bassiana**	Dieta del picudo

* Potencialmente patógeno.

** Patógeno.

TABLA 3

SENSIBILIDAD A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS DE BACTERIAS AISLADAS DE UN SISTEMA DE CRIA MASIVA DE CATOLACCUS GRANDIS.

BACTERIA	CEPA	ANTIMICROBIANO *											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AEROMONAS HYDROPHILA	I	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	I
	II	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	I	
	III	R	S	R	S	R	R	R	I	R	S	R	R
	IV	S	S	R	I	R	S	S	I	S	S	R	I
	V	I	I	S	I	I	R	R	S	R	R	S	I
	VI	I	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R
CITROBACTER FREUNDII	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	I
	II	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	I
	III	I	I	R	S	R	S	S	R	S	S	R	I
PSEUDOMONAS FLUORESCENS	I	I	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	I
PSEUDOMONAS AERUGINOSA	I	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	I
	II	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	I
	III	I	I	S	S	R	R	R	S	S	S	S	I
	IV	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	I
ENTEROBACTER AGGLOMERANS	I	I	I	R	S	R	S	S	R	S	S	R	I
	II	I	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	I
	III	I	S	I	R	R	R	R	S	I	S	S	I
	IV	S	R	R	S	R	R	S	S	R	S	R	I
MICROCOCCUS SP.	I	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	I
	II	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	I
SERRATIA SP.	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	I
FLAVOBACTERIUM SP.	I	I	I	S	I	I	R	R	S	R	S	S	I
SALMONELLA SP.	I	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	I

*1 SXT, 2AK, 3AM, 4CB, 5CF, 6CTX, 7CRO, 8CL, 9GE, 10NET, 11NF, 12PEF. S= SUSCEPTIBLE, R= RESISTENTE, I= INTERMEDIA

cámaras de emergencia del parasitoide. Amikacina y Netilmicina fueron los antimicrobianos a los que todas las bacterias aisladas fueron sensibles.

6.3 Contaminación de huevecillos. Efecto de diferentes sustancias desinfectantes sobre la flora bacteriana presente en los huevecillos del parasitoide.

Los resultados de la evaluación de las sustancias desinfectantes que se probaron en diferentes tiempos y concentraciones se muestran en las tablas 4, 5, 6 y 7 y figuras 6 a 18 (página 62). El análisis bacteriológico del líquido obtenido del lavado de los huevecillos comparado con el testigo (Figura 9) mostró que el iodo 0.63% / 1 min. fue el más efectivo para reducir el número de microorganismos contaminantes no produce daños a los huevecillos ni afecta la eclosión. De las cuatro sustancias desinfectantes probadas, comparadas con el testigo, el iodo a 0.63% con un minuto de exposición fue la sustancia más efectiva para reducir la flora bacteriana presente. Con el hipoclorito, el mayor porcentaje de eclosión se obtuvo cuando se utilizaron las concentraciones 0.5% y 0.75% y tiempos 60 segundos y 120 segundos. Con las concentraciones más altas se observó daño a larvas recién emergidas. Con el sulfato de cobre fue más efectiva la concentración 2% en todos los tiempos, las otras concentraciones fueron efectivas pero se observaron daños a huevecillos y a larvas recién eclosionadas. La eclosión comparada con el testigo cuando se utilizó alcohol etílico en el tiempo de 60 segundos y la concentración de 70% y tiempo de 120 segundos y concentración 80% fue mayor. El alcohol etílico fue el menos efectivo para el control de bacterias en todos los tiempos de las concentraciones 50% y 60%.

El análisis multifactorial para determinar el efecto en la eclosión de huevecillos de *C. grandis* de las sustancias utilizadas en diferentes tiempos y concentraciones muestra diferencia significativa en los factores sustancia, tiempo y concentraciones y en la interacción de estos factores. (Tabla 8). Los promedios de eclosión para las diferentes sustancias, concentraciones y tiempos se muestran en la Tabla 9. Para la concentración muy baja, el mayor promedio de huevecillos eclosionados se registró cuando se utilizaron

el yodo y el sulfato de cobre en los tiempos 60 y 180 segundos, el menor promedio fue para el alcohol etílico.

Cuando se utilizó la concentración baja, hipoclorito y sulfato de cobre tuvieron el mayor promedio de eclosión en los tres tiempos, con alcohol etílico la eclosión fue menor. Con la concentración media, se observó mayor eclosión con el sulfato de cobre en el tiempo de 120 segundos. Con la concentración alta, la mayor eclosión se obtuvo cuando se utilizó alcohol etílico (120segundos) y con el yodo (60 segundos), con el sulfato de cobre (120 segundos y alcohol etílico (180 segundos) se observó la menor eclosión.

TABLA 4

ACCION GERMICIDA DEL IODO SOBRE LA FLORA BACTERIANA PRESENTE EN HUEVOS DE *Catolaccus grandis* (AGUA DE ENJUAGUE) EN DIFERENTES TIEMPOS Y CONCENTRACIONES.

TIEMPO DE EXPOSICION SEG	CONCENTRACION %	UFC/ml	ACCION GERMICIDA %	ECLOSION %
60	2.50	0	100.00	70
60	2.00	0	100.00	40
60	1.25	20	99.63	50
60	0.63	20	99.63	96
120	2.50	15	99.72	60
120	2.00	15	99.72	40
120	1.25	20	99.63	45
120	0.63	20	99.63	73
180	2.50	20	99.63	35
180	2.00	20	99.63	46
180	1.25	20	99.63	59
180	0.63	20	99.63	85

TABLA 5

ACCION GERMICIDA DEL SULFATO DE COBRE SOBRE LA FLORA BACTERIANA PRESENTE EN HUEVECILLOS DE *Catolaccus grandis* (AGUA DE ENJUAGUE) EN DIFERENTES TIEMPOS Y CONCENTRACIONES

TIEMPO DE EXPOSICION SEG.	CONCENTRACION %	UFC/ml	ACCION GERMICIDA %	ECLOSION %
60	18.00	40	99.26	45
60	9.00	40	99.26	60
60	4.00	10	99.81	95
60	2.00	10	99.81	90
120	18.00	0	100.00	20
120	9.00	40	99.26	80
120	4.00	10	99.81	70
120	2.00	10	99.81	80
180	18.00	0	100.00	20
180	9.00	40	99.26	50
180	4.00	10	99.81	80
180	2.00	10	99.81	90

TABLA 6

ACCION GERMICIDA DEL HIPOCLORITO SOBRE LA FLORA BACTERIANA PRESENTE EN HUEVECILLOS DE *Catolaccus grandis* (AGUA DE ENJUAGUE) EN DIFERENTES TIEMPOS Y CONCENTRACIONES.

TIEMPO DE EXPOSICION SEG.	CONCENTRACION %	UFC/ml	ACCION GERMICIDA %	ECLOSION %
60	2.00	40	99.26	60
60	1.50	40	99.26	40
60	0.75	36	99.34	75
60	0.50	36	99.34	60
120	2.00	20	99.63	30
120	1.50	20	99.63	35
120	0.75	36	99.34	75
120	0.50	40	99.26	60
180	2.00	20	99.63	20
180	1.50	20	99.63	40
180	0.75	36	99.34	85
180	0.50	36	99.34	90

TABLA 7

ACCION GERMICIDA DEL ALCOHOL ETILICO SOBRE LA FLORA BACTERIANA PRESENTE EN HUEVECILLOS DE *Catofaccus grandis* (AGUA DE ENJUAGUE) EN DIFERENTES TIEMPOS Y CONCENTRACIONES.

TIEMPO DE EXPOSICION SEG.	CONCENTRACION %	UFC/ml	ACCION GERMICIDA %	ECLOSION %
60	80.00	21	99.61	60
60	70.00	12	99.77	55
60	60.00	5400	0.00	55
60	50.00	5400	0.00	55
120	80.00	21	99.61	85
120	70.00	12	99.77	45
120	60.00	5400	0.00	45
120	50.00	5400	0.00	45
180	80.00	21	99.61	30
180	70.00	12	99.77	45
180	60.00	5400	0.00	55
180	50.00	5400	0.00	50

TABLA 8

Análisis de varianza de los datos de eclosión de los huevecillos de *C. grandis* después de utilizar cuatro microbicidas en cuatro concentraciones y tres tiempos diferentes.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
FACTOR A	3	5136.937500	1712.312500	274.8863**	0.000
FACTOR B	2	1500.593750	750.296875	120.4490**	0.000
FACTOR C	3	18934.875000	6311.625000	1013.2375**	0.000
A X B	6	1341.093750	223.515625	35.8821**	0.000
A X C	9	19082.187500	2120.243164	340.3735**	0.000
B X C	6	4349.656250	724.942688	116.3788**	0.000
A X B X C	18	6508.656250	361.592010	58.0482**	0.000
ERROR	96	598.000000	6.229167		
TOTAL	143	57452.000000			

** ALTAMENTE SIGNIFICATIVO.

TABLA 9

Análisis de las medias de tratamientos de la interacción de: sustancias, tiempos, y concentraciones y su relación con huevecillos de *C. grandis*.

SUSTANCIA	TIEMPO (SEGUNDOS)	CONCENTRACION			
		MUY BAJA	BAJA	MEDIA	ALTA
IODO	60	96	50	40	70
	120	73	45	40	59
	180	84	59	46	38
HIPOCLORITO	60	61	75	40	58
	120	60	74	31	30
	180	88	84	40	20
SULFATO DE COBRE	60	91	93	60	45
	120	82	72	73	20
	180	88	93	56	41
ALCOHOL ETILICO	60	55	55	55	58
	120	45	45	45	83
	180	50	53	43	35

TUKEY=7.4

NOTA: SI EN LA TABLA LA DIFERENCIA DE DOS MEDIAS ES MAYOR QUE 7.4, ENTONCES LAS MEDIAS SON DIFERENTES CON UN NIVEL DE SIGNIFICANCIA DE 0.05

El análisis de varianza del crecimiento de bacterias en relación a 4 concentraciones de microbicidas en 3 tiempos diferentes que fueron utilizadas para el lavado de huevecillos de *C. grandis* indicó diferencia significativa para los factores sustancia, tiempo y concentraciones y para la interacción de estos factores. (Tabla 10).

El análisis de los promedios de colonias de bacterias que crecieron (Tabla 11) muestra que el número de colonias de bacterias fue mayor cuando se utilizó alcohol etílico en los tres tiempos y menor cuando se utilizó iodo, hipoclorito y sulfato de cobre en las concentraciones baja y muy baja.

Con la concentración media se observó el mayor promedio de crecimiento de colonias de bacterias cuando se utilizó sulfato de cobre en los 3 tiempos e hipoclorito en el tiempo de 60 segundos. El promedio de crecimiento en iodo e hipoclorito en el tiempo de 180 segundos fue similar al observado en alcohol etílico (60 segundos) e hipoclorito (120 segundos). El menor promedio de crecimiento de colonias de bacterias se obtuvo con el iodo (60 y 120 segundos) y con el alcohol etílico (120 y 180 segundos). Cuando se utilizó la concentración alta, el mayor crecimiento de colonias de bacterias se observó cuando se utilizó iodo, hipoclorito y alcohol etílico (180 segundos) pero no fue diferente estadísticamente de hipoclorito (120 y 180 segundos) sulfato de cobre y alcohol etílico (60 segundos) y sulfato de cobre (120 y 180 segundos).

El iodo en todas las concentraciones y tiempos fue el que permitió mayor eclosión de huevecillos de *C. grandis* aunque con el hipoclorito hubo efectos similares en algunas de las concentraciones y tiempos. El crecimiento bacteriano en los tratamientos con las mismas sustancias fue menor cuando se utilizó sulfato de cobre pero dado que daña significativamente a los huevecillos no se considera el más efectivo a diferencia del iodo que además de no afectar la eclosión inhibe el crecimiento de colonias de bacterias en forma importante.

TABLA 10

Análisis de varianza del número de colonias después de utilizar 4 microbicidas en 4 concentraciones y 3 tiempos diferentes para el lavado de huevecillos de *Catolaccus grandis*.

FV	GL	SC	CM	F	P > F
BLOQUES	2	88.0000	44.0000	13.9730	0.005
FACTOR A (SUSTANCIAS)	3	194839.0000	6494.0000	2062.0000 **	0.002
FACTOR B (TIEMPO)	2	240.0000	120.0000	38.1081	0.000
FACTOR C (DOSIS)	3	65251.0000	2175.0000	69072.0000 **	0.000
A X B	6	1928.0000	321.0000	102.0450	0.000
A X C	9	19559.0000	217333.0000	69017.5000 **	0.000
B X C	6	672.0000	112.0000	35.5676	0.000
A X B X C	18	3272.0000	181.0000	57.7267	0.000
ERROR	94	296.0000	3.1489		
TOTAL	143	45569.0000			

** ALTAMENTE SIGNIFICATIVO

TABLA 11

Análisis de las medias de tratamientos de la interacción de: sustancias, tiempos y concentraciones de colonias de bacterias que crecieron después de utilizar diversos tratamientos para el lavado de huevecillos de *C. grandis*.

SUSTANCIA	TIEMPO (SEGUNDOS)	CONCENTRACION			
		MUY BAJA	BAJA	MEDIA	ALTA
IODO	60	20	20	0	0
	120	20	20	15	15
	180	20	20	20	20
HIPOCLORITO	60	36	36	40	40
	120	40	36	20	20
	180	36	36	20	20
SULFATO DE COBRE	60	10	10	40	40
	120	10	10	40	0
	180	10	10	40	0
ALCOHOL ETILICO	60	5400	5400	12	21
	120	5400	5400	12	21
	180	5400	5400	12	21

TUKEY=1.8

NOTA: SI EN LA TABLA LA DIFERENCIA DE DOS MEDIAS ES MAYOR QUE 7.4, ENTONCES LAS MEDIAS SON DIFERENTES CON UN NIVEL DE SIGNIFICANCIA DE 0.05

6.4 Evaluación de conservadores adicionados a la dieta estándar del parasitoide.

De acuerdo al análisis de varianza de los datos de eclosión de huevecillos de *C. grandis* (Tabla 12) solo el factor dietas fue estadísticamente significativo. La Tabla 13 muestra que el mayor promedio de eclosión correspondió a los huevecillos que fueron colocados en la dieta sorbato de potasio-propionato de sodio (dieta 2). Los promedios de eclosión de las dietas benzoato de sodio, propionato de sodio (dieta 1) y estándar no difirieron estadísticamente entre sí.

TABLA 12

Análisis de varianza de los datos de eclosión de huevecillos de *C. grandis* tratados y no tratados con lodo 0.063% / 1 min colocados en tres dietas con diferentes combinaciones de inhibidores.

	FV	GL	SC	CM	F	P>F
BLOQUES		2	2.779297	1.389648	0.3872	0.693
FACTOR A (DIETAS)		2	395.111328	197.555664	55.0498 **	0
FACTOR B (CON Y SIN IODO)		1	0.890625	0.890625	0.2482	0.633
INTERACCION (A X B)		2	21.777344	10.888672	3.0342	0.092
ERROR		10	35.886719	3.588672		
TOTAL		17	456.445313			

** ALTAMENTE SIGNIFICATIVO

TABLA 13

Promedio de eclosión de huevecillos de *Catolaccus grandis* en dietas con diferentes combinaciones de inhibidores de microorganismos.

NIVELES	COMPARACION DE MEDIAS
DIETA 2*	47.00 A
DIETA 1 **	38.00 B
DIETA ESTANDAR	36.33 B

PROMEDIO CON LETRAS IGUALES NO ES ESTADISTICAMENTE DIFERENTE

DE ACUERDO A TUKEY, A UN NIVEL DE SIGNIFICANCIA DE 0.05

*SORBATO DE POTASIO-PROPIONATO DE SODIO.

** BENZOATO DE SODIO-PROPIONATO DE SODIO.

El análisis de varianza de la emergencia de adultos de *C. grandis* en relación con la utilización de diferentes dietas y huevecillos del parasitoide tratados y no tratados con iodo, muestra que hubo significancia en los factores (Tabla 14). La comparación de medias entre las dietas probadas para cada uno de los niveles del factor "iodo" (con iodo y sin iodo) (Tabla 15) muestra que el mayor promedio de emergencia de adultos del parasitoide se registró cuando se utilizó la dieta 2. La dieta 1 registró menor promedio de emergencia y la dieta estándar el menor.

TABLA 14

Análisis de la varianza de los resultados de la evaluación de la dieta estándar (Guerra, 1993) y dietas 1^A y 2^{AA} utilizando huevecillos de *C. grandis* lavados y sin lavar con iodo 0.63 % / 1 min. y su relación con la emergencia de adultos.

FV	GL	SC	CM	F	P > F
FACTOR A (DIETAS)	2	219.000000	109.50	93.8624 **	0
FACTOR B (CON Y SIN IODO)	1	72.000000	72.00	61.7177 **	0
INTERACCION	2	21.000000	10.50	9.0005 *	0.006
ERROR	10	11.666016	1.16		
TOTAL	15	326.660160			

^A Mezcla de sodio 0.01 % - Propionato de sodio 0.032 %

^{AA} Sorbato de potasio 0.032 % - Propionato de sodio 0.032 %

*SIGNIFICATIVO

**ALTAMENTE SIGNIFICATIVO

TABLA 15

Emergencia de adultos de *Catolaccus grandis* en dietas con diferentes combinaciones de inhibidores de microorganismos.

NIVELES	COMPARACION DE MEDIAS			
	CON IODO		SIN IODO	
DIETA ESTANDAR	38	C (A)	31	D (B)
DIETA 1	41	B (A)	38	C (B)
DIETA 2	44	A (A)	42	B (B)

PROMEDIO CON LETRAS IGUALES NO ES ESTADISTICAMENTE DIFERENTE

DE ACUERDO A TUKEY, A UN NIVEL DE SIGNIFICANCIA DE 0.05

PARA CADA COLUMNA, LAS MEDIAS CON LETRAS IGUALES NO SON ESTADISTICAMENTE DIFERENTES DE ACUERDO A TUKEY,

A UN NIVEL DE SIGNIFICANCIA DE 0.05.

PARA CADA HILERA, (EN PARENTESIS) LAS MEDIAS CON LETRAS IGUALES NO SON ESTADISTICAMENTE DIFERENTES DE ACUERDO

A TUKEY, A UN NIVEL DE SIGNIFICANCIA DE 0.05.

La Tabla 16 muestra el análisis de varianza del desarrollo de colonias de hongos en las diferentes dietas utilizadas en este estudio. Se encontró significancia en el factor dietas y en el factor “iodo” (con iodo y sin iodo) e interacción en ambos factores.

La comparación de medias se muestra en la Tabla 17 donde se observa que la dieta estándar no fue estadísticamente diferente para los dos niveles de iodo. Con la dieta 2 no hubo diferencia significativa para este factor (Tabla 17, hileras). Hubo mayor inhibición de colonias de hongos cuando se utilizó la dieta 2 (Tabla 17, columnas).

La Tabla 18 muestra el análisis de varianza del crecimiento de colonias de bacterias en 3 dietas con diferentes combinaciones de inhibidores que se utilizaron para la cría masiva de *C. grandis*. No hubo significancia para ninguno de los factores e interacciones. En lo que respecta a las dietas, el mayor promedio de eclosión y emergencia de adultos del parasitoide y el menor número de colonias de hongos que crecieron en las mismas se logró cuando se utilizó la dieta 2, esto, aunado a que las sustancias utilizadas como inhibidores son fáciles de adquirir, se requieren cantidades mínimas y no afectan el ciclo vital del parasitoide la convierten en una opción para el control de microorganismos en dietas artificiales para cría masiva de este y tal vez otros parasitoides.

TABLA 16

Análisis de varianza del desarrollo de colonias de hongos en tres dietas con diferentes combinaciones de inhibidores en huevecillos de *C. grandis* con y sin iodo 0.63% / 1 min.

FV	GL	SC	CM	F	P > F
FACTOR A (DIETAS)	2	2.111111	1.055555	19.0000 *	0.001
FACTOR B (CON Y SIN IODO)	1	9.388889	9.388889	169.0001 **	0.000
INTERACCION (A X B)	2	0.777777	0.388888	7.0000	0.013
ERROR	10	0.555555	0.055556		
TOTAL	15	12.822222			

* SIGNIFICATIVO

** ALTAMENTE SIGNIFICATIVO

TABLA 17

Numero de colonias de hongos en 3 dietas para cria masiva de *Catolaccus grandis* utilizando diferentes combinaciones de inhibidores y huevecillos tratados y sin tratar con iodo.

FACTOR A (DIETAS)	COMPARACION DE MEDIAS			
	CON IODO		SIN IODO	
DIETA ESTANDAR	1.00	A (B)	2.00	A (A)
DIETA 1	0.00	B (B)	2.00	A (A)
DIETA 2	0.02	B (B)	1.33	B (A)

PROMEDIO CON LETRAS IGUALES NO ES ESTADISTICAMENTE DIFERENTE DE ACUERDO A TUKEY, A UN NIVEL DE SIGNIFICANCIA DE 0.05
 PARA CADA COLUMNA, LAS MEDIAS CON LETRAS IGUALES NO SON ESTADISTICAMENTE DIFERENTES DE ACUERDO A TUKEY, A UN NIVEL DE SIGNIFICANCIA DE 0.05.
 PARA CADA FILERA, (EN PARENTESIS) LAS MEDIAS CON LETRAS IGUALES NO SON ESTADISTICAMENTE DIFERENTES DE ACUERDO A TUKEY, A UN NIVEL DE SIGNIFICANCIA DE 0.05.

TABLA 18

Análisis de varianza del crecimiento de colonias de bacterias en tres dietas con diferentes combinaciones de inhibidores y huevecillos de *C. grandis* lavados y sin lavar con iodo 0.63 % / 1 min.

FV	GL	SC	CM	F	P > F
BLOQUES	2	17.444443	8.722221	10.1948 *	0.004
FACTOR A (DIETA)	2	5.444443	2.722221	3.1818	0.084
FACTOR B (CON Y SIN IODO)	1	0.888893	0.888893	1.039	0.334
INTERACCION (A X B)	2	1.444443	0.722221	0.8442	0.539
ERROR	10	8.555557	0.855556		
TOTAL	17	33.777779			

* SIGNIFICATIVO

6.5 Evaluación de diversos tratamientos con microbicidas para prevenir la contaminación microbiana del equipo y materiales del sistema de cría de *C. grandis*.

En las Tablas 19 y 20 se observan los resultados de la evaluación "in vitro" del efecto del dióxido de cloro y sales cuaternarias de amonio (Timsen) sobre las bacterias. En las Tablas 21 a 24 se observan los resultados de la acción del dióxido de cloro, sales cuaternarias de amonio, benomil y mancozeb sobre hongos. La concentración más baja de dióxido de cloro que logró inhibir a una bacteria fue 500 ppm en un minuto de exposición (*E. agglomerans*), 400 ppm en cinco minutos (*Aeromonas*, *Enterobacter*) y 150 ppm en 10 minutos (*C. freundii*). La concentración más alta de las probadas de ClO₂ que logró inhibir a una bacteria en un minuto de exposición fue de 1000 ppm (*P. fluorescens*, *Salmonella*), en cinco minutos de 800 ppm (*C. freundii*) y en 10 minutos de 700 ppm (*C. freundii*). Respecto a las sales cuaternarias de amonio, la concentración más baja que inhibió una bacteria fue de 250 ppm en un minuto de exposición (*P. fluorescens*, *E. agglomerans*) y 50 ppm en 5 y 10 minutos. (*P. fluorescens*). La concentración más alta de las probadas que inhibió una bacteria en un minuto de exposición fue de 450 ppm (*C. freundii*) en cinco minutos de 350 ppm (*C. freundii*) y en 10 minutos de 250 ppm (*P. fluorescens*). Dióxido de cloro y sales cuaternarias de amonio fueron efectivos para inhibir el crecimiento de las cuatro especies de hongos en las tres concentraciones probadas hasta el quinto día excepto *A. flavus* en el quinto día a la concentración 1 (100ppm) de sales cuaternarias de amonio. Para el decimocuarto día, las concentraciones 1 y 2 de dióxido de cloro solo inhibieron a *A. flavus* y *Rhizopus sp.* y sales cuaternarias de amonio a la concentración 1 inhibió a *Penicillium sp.* y *Rhizopus sp.* Mancozeb y benomil inhibieron el crecimiento "in vitro" de las cuatro cepas de hongos hasta el quinto día a la concentración recomendada por el fabricante pero no lo inhibieron a la concentración 1/10 ni a los 14 días post-inoculación. Benomil inhibió el crecimiento de las cuatro cepas de hongos a los 5 y 14 días post-inoculación a la concentración recomendada por el fabricante. La dilución 1/10 permitió que *A. niger* y *A. flavus*

crecieran hasta 5 días post-inoculación, sin embargo, después de este tiempo se observó crecimiento de todas las cepas.

Tabla 19.- Concentración mínima inhibitoria (CMI) en ppm del dióxido de cloro para diferentes bacterias aisladas del sistema de de cría masiva de *C. grandis*.

BACTERIA	CEPA	TIEMPO (MINUTOS)		
		1	5	10
<i>Pseudomonas fluorescens.</i>	I	1000	600	400
	II	900	500	250
	III	900	600	400
<i>P. aeruginosa</i>	I	850	750	600
<i>Citrobacter freundii.</i>	I	850	650	450
	II	900	800	700
	III	900	700	500
<i>Enterobacter agglomerans.</i>	I	850	650	450
	II	900	400	500
	III	500	400	150
<i>Aeromonas hydrophila.</i>	I	700	400	150
	II	700	400	150
<i>Salmonella sp.</i>	I	1000	650	500

Tabla 20.- Concentración mínima inhibitoria (CMI) en ppm de las sales cuaternarias de amonio para diferentes bacterias aisladas del sistema de cría masiva de *C. grandis*.

BACTERIA	CEPA	TIEMPO (MINUTOS)		
		1	5	10
<i>Pseudomonas fluorescens.</i>	I	400	350	250
	II	250	200	50
	III	250	50	50
<i>P. aeruginosa</i>	I	400	250	200
<i>Citrobacter freundii.</i>	I	450	350	200
	II	450	350	200
	III	450	400	250
<i>Enterobacter agglomerans.</i>	I	300	250	200
	II	400	300	200
	III	250	200	150
<i>Aeromonas hydrophila.</i>	I	350	200	150
	II	300	200	100
<i>Salmonella sp.</i>	I	400	300	200

Tabla 21.- Efecto del dióxido de cloro sobre el crecimiento "in vitro" de hongos aislados en el sistema de cría masiva de *C. grandis* en diferentes concentraciones.

TIEMPO (DIAS)	ESPECIES DE HONGOS											
	<i>Aspergillus niger</i>			<i>A. flavus.</i>			<i>Penicillium</i> <i>sp.</i>			<i>Rhizopus sp.</i>		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

C1= 100 ppm

C2= 200 ppm

C3= 300 ppm

-no creció

+hubo crecimiento

Tabla 22.- Efecto de las sales cuaternarias de amonio (TIMSEN) sobre el crecimiento *in vitro* de hongos aislados en el sistema de cría masiva de *C. grandis* en diferentes concentraciones.

TIEMPO (DIAS)	ESPECIES DE HONGOS											
	<i>Aspergillus niger</i>			<i>A. flavus.</i>			<i>Penicillium sp.</i>			<i>Rhizopus sp.</i>		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

C1= 100 ppm

C2= 200 ppm

C3= 300 ppm

- no creció

+ hubo crecimiento

Tabla 23.- Efecto del fungicida mancozeb* sobre el crecimiento "in vitro" de hongos aislados en el sistema de cría masiva de *C. grandis* en diferentes concentraciones.

TIEMPO (DIAS)	ESPECIES DE HONGOS							
	<i>Aspergillus niger</i>		<i>A. flavus.</i>		<i>Penicillium sp.</i>		<i>Rhizopus sp.</i>	
	X	X/1	X	X/1	X	X/10	X	X/10
		0		0				
3	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	+	-	+	-	+	-	+
14	+	+	+	+	-	+	+	+

* Etilen-bis-ditiocarbamato + oxiclóruro de cobre.

X= Dosis recomendada por el fabricante. (36 %)

X/10= Dilución 1:10

- no creció

+ hubo crecimiento

Tabla 24.- Efecto del fungicida benomil* sobre el crecimiento "in vitro" de hongos aislados en el sistema de cría masiva de *C. grandis* en diferentes concentraciones.

TIEMPO (DIAS)	ESPECIES DE HONGOS							
	<i>Aspergillus niger</i>		<i>A. flavus.</i>		<i>Penicillium sp.</i>		<i>Rhizopus sp.</i>	
	X	X/1	X	X/10	X	X/10	X	X/10
		0						
3	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	+	-	+	-	-	-	-
14	-	+	-	+	-	+	-	+

* Benimidazol carbamato.

X=Dosis recomendada por el fabricante. (50%)

X/10= Dilución 1:10

- no creció

+ hubo crecimiento

6.6 Evaluación de materiales para proteger las oviposiciones y coleccionar los huevecillos de los parasitoides.

Los resultados de este estudio indican que la membrana estándar de parafilm utilizada para cubrir las cámaras de cría placas Multiwell (del tipo utilizado para cultivo de tejidos) puede ser reemplazada con éxito por una membrana de polietileno. La eficiencia expresada en número de huevecillos por cámara de cría indicó que la membrana de polietileno es dos veces más efectiva que la membrana de parafilm; el papel encerado resultó ser el menos eficiente.

En cuanto al costo, el parafilm en esta prueba fue en promedio 55 veces más caro comparado con el costo de la membrana plástica adherible. Además de ser considerablemente más económica y eficiente la membrana de polietileno es fácil de conseguir y transparente, facilita la observación del desarrollo larval y no requiere ser retirada de las cámaras de cría para las observaciones periódicas rutinarias lo cual contribuye a evitar la contaminación.

Las pruebas estadísticas de comparación de medias indicaron que no existe diferencia significativa entre el parafilm y el polietileno para microondas al nivel de 0.05. Tampoco hubo diferencia significativa entre el polietileno para microondas, el polietileno regular y el papel encerado (Tabla 25). La única diferencia significativa fue entre el parafilm y el polietileno regular y el papel encerado.

Tabla 25. Evaluación de membranas como cubiertas de cámaras de cría para *C. grandis*

Membrana	Eficiencia N° promedio de huevecillos
Parafilm (control)	68 A
Polietileno (microondas)	51 AB
Polietileno (regular)	34 B
Papel encerado	33 B

Las medias en una columna seguidas de la misma letra (A, B) no son significativamente diferentes al nivel 0.05 de la prueba de Duncan.

FIGURA 6

ACCION GERMICIDA DEL IODO SOBRE LA FLORA BACTERIANA PRESENTE EN HUEVECILLOS DE *C. grandis* (AGUA DE ENJUAGUE) A UN TIEMPO DE EXPOSICION DE 60 SEGUNDOS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES.

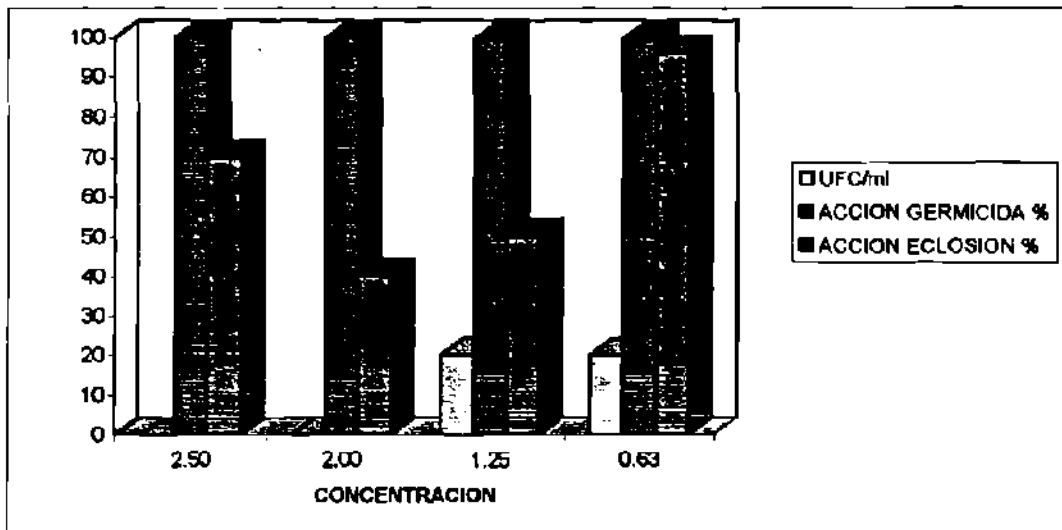


FIGURA 7

ACCION GERMICIDA DEL IODO SOBRE LA FLORA BACTERIANA PRESENTE EN HUEVECILLOS DE *C. grandis* (AGUA DE ENJUAGUE) A UN TIEMPO DE EXPOSICION DE 120 SEGUNDOS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES.

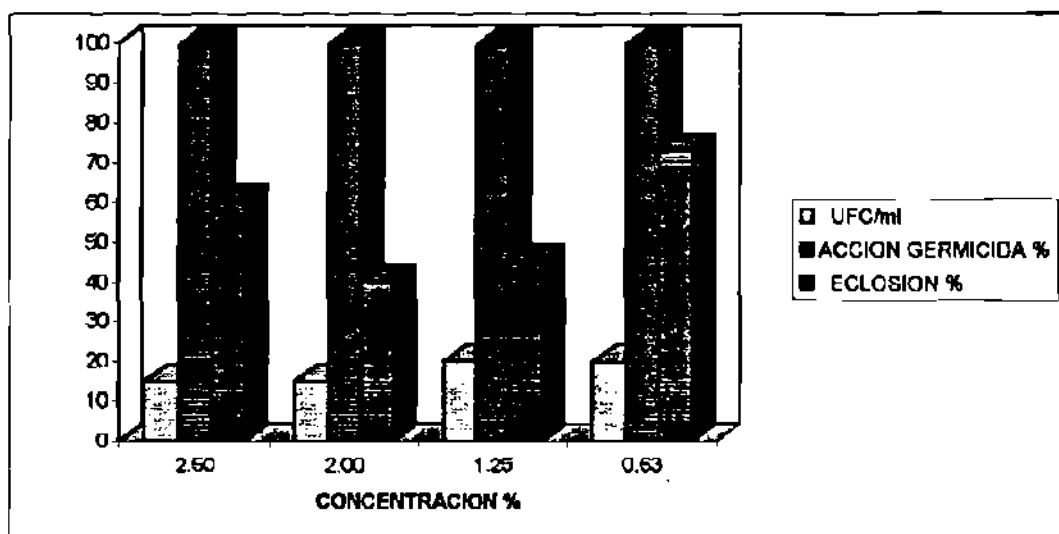


FIGURA 8

ACCION GERMICIDA DEL IODO SOBRE LA FLORA BACTERIANA PRESENTE EN HUEVECILLOS DE *C. grandis* (AGUA DE ENJUAGUE) A UN TIEMPO DE EXPOSICION DE 180 SEGUNDOS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES.

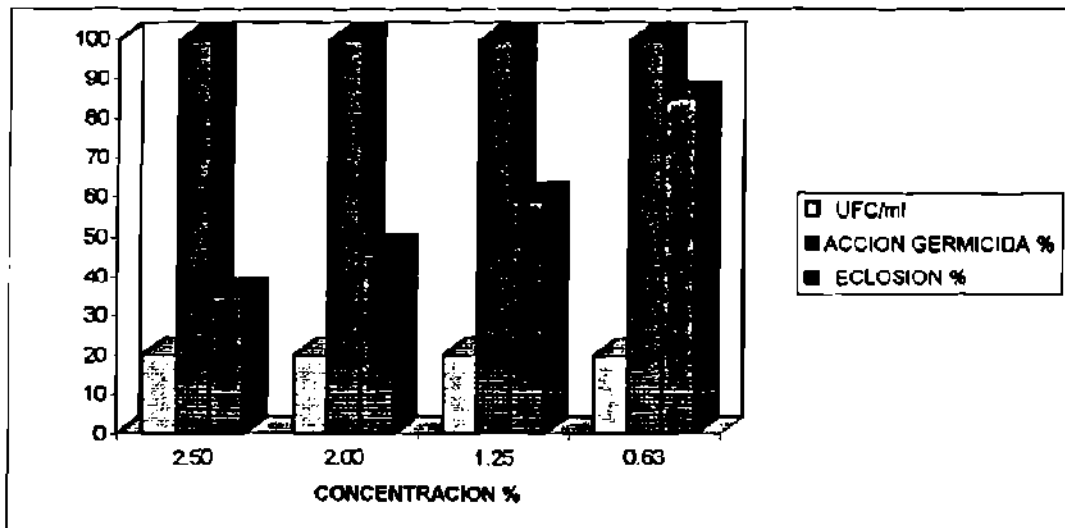


FIGURA 9

**FLORA BACTERIANA PRESENTE EN HUEVECILLOS
DE *C. grandis* EN EL TESTIGO (AGUA DE ENJUAGUE SIN GERMICIDA)**

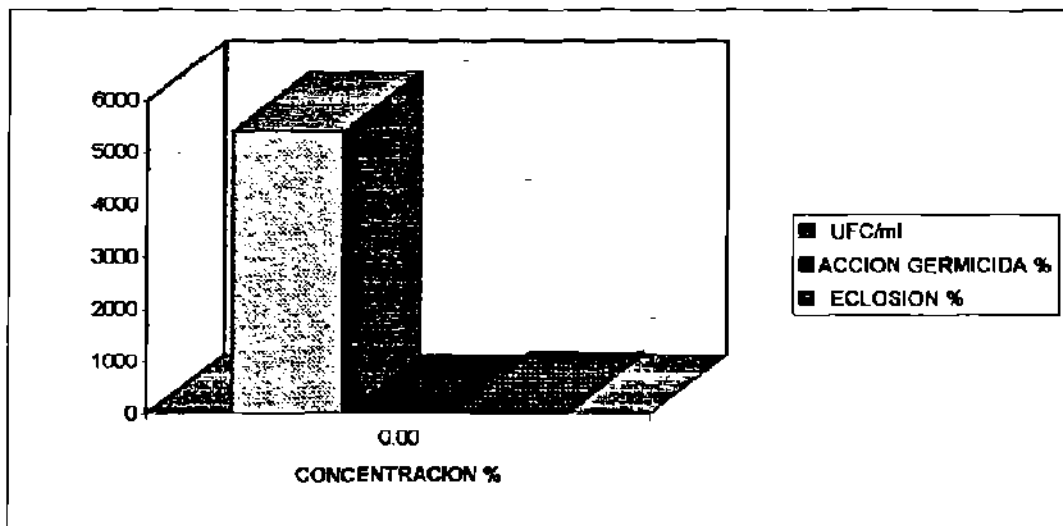


FIGURA 10

ACCION GERMICIDA DEL SULFATO DE COBRE SOBRE LA FLORA BACTERIANA PRESENTE EN HUEVECILLOS DE *C. grandis* (AGUA DE ENJUAGUE) A UN TIEMPO DE EXPOSICION DE 60 SEGUNDOS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES.

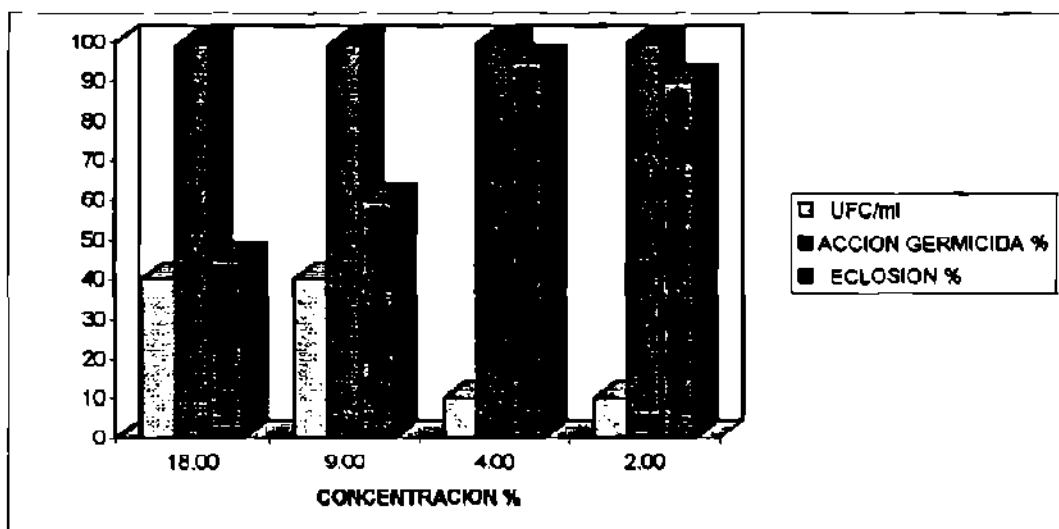


FIGURA 11

ACCION GERMICIDA DEL SULFATO DE COBRE SOBRE LA FLORA BACTERIANA PRESENTE EN HUEVECILLOS DE *C. grandis* (AGUA DE ENJUAGUE) A UN TIEMPO DE EXPOSICION DE 120 SEGUNDOS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES.

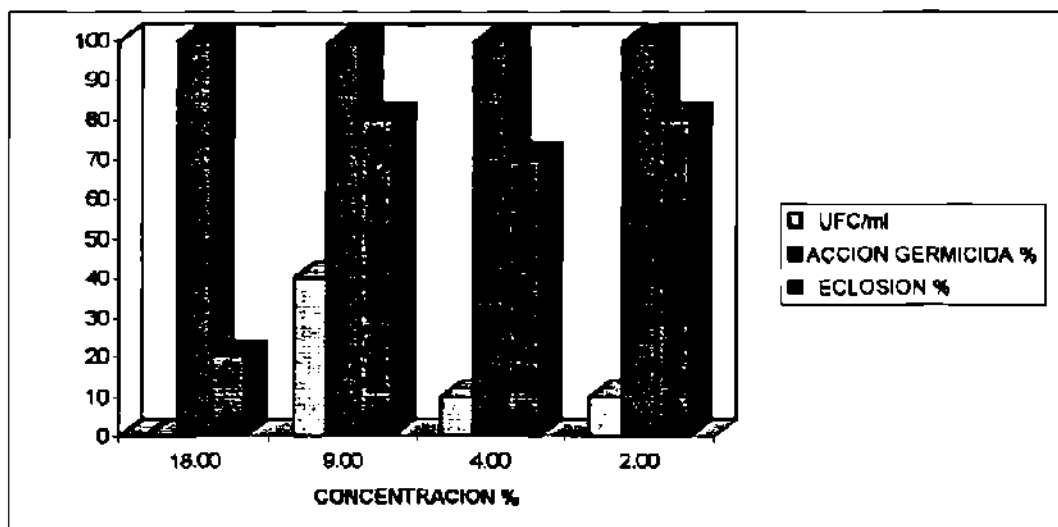


FIGURA 12

ACCION GERMICIDA DEL SULFATO DE COBRE SOBRE LA FLORA BACTERIANA PRESENTE EN HUEVECILLOS DE *C. grandis* (AGUA DE ENJUAGUE) A UN TIEMPO DE EXPOSICION DE 180 SEGUNDOS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES.

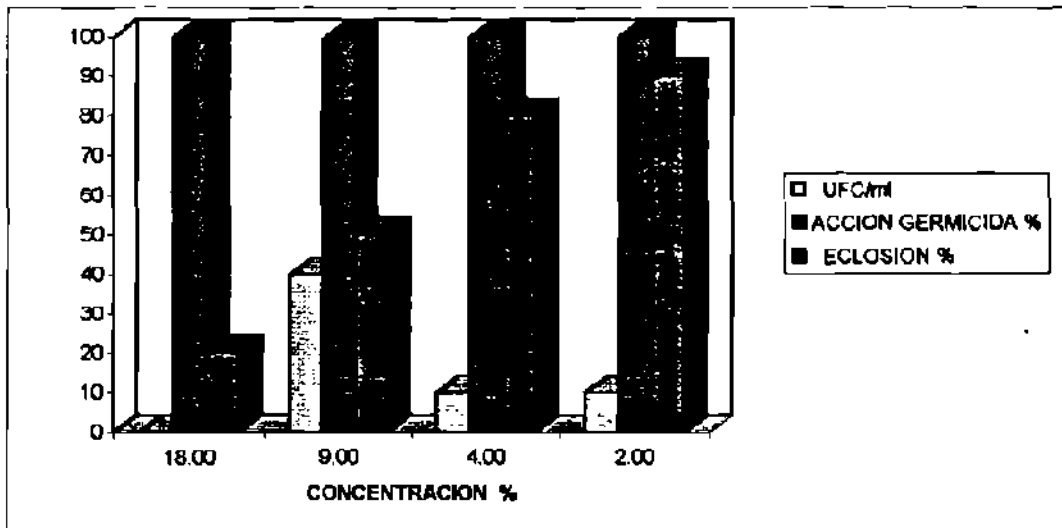


FIGURA 13

ACCION GERMICIDA DEL HIPOCLORITO SOBRE LA FLORA BACTERIANA PRESENTE EN HUEVECILLOS DE *C. grandis* (AGUA DE ENJUAGUE) A UN TIEMPO DE EXPOSICION DE 60 SEGUNDOS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES.

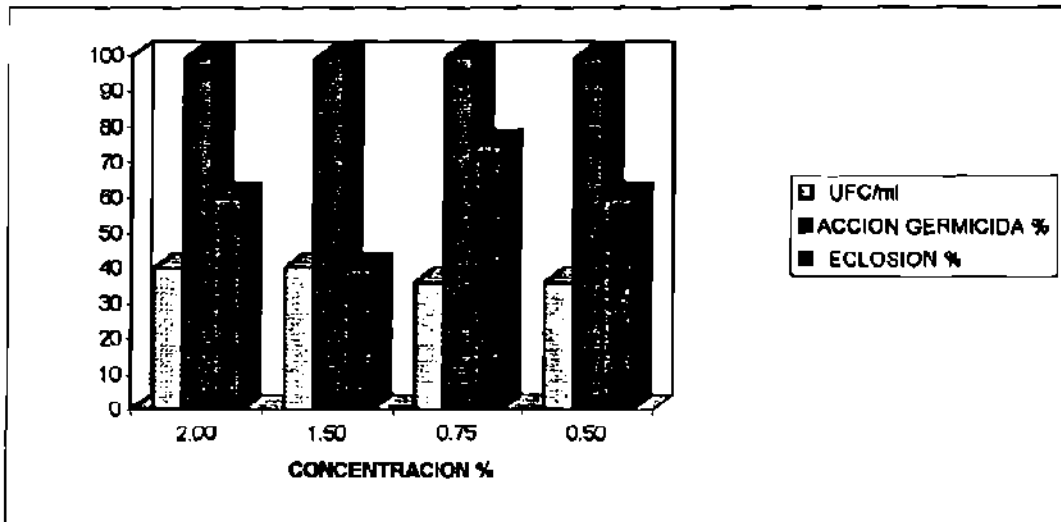


FIGURA 14

ACCION GERMICIDA DEL HIPOCLORITO SOBRE LA FLORA BACTERIANA PRESENTE EN HUEVECILLOS DE *C. grandis* (AGUA DE ENJUAGUE) A UN TIEMPO DE EXPOSICION DE 120 SEGUNDOS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES.

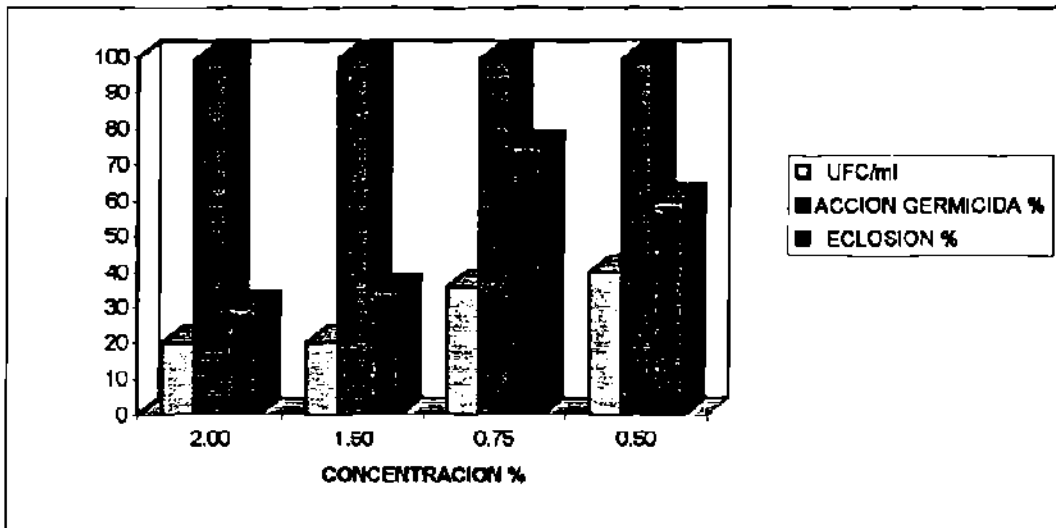


FIGURA 15

ACCION GERMICIDA DEL HIPOCLORITO SOBRE LA FLORA BACTERIANA PRESENTE EN HUEVECILLOS DE *C. grandis* (AGUA DE ENJUAGUE) A UN TIEMPO DE EXPOSICION DE 180 SEGUNDOS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES.

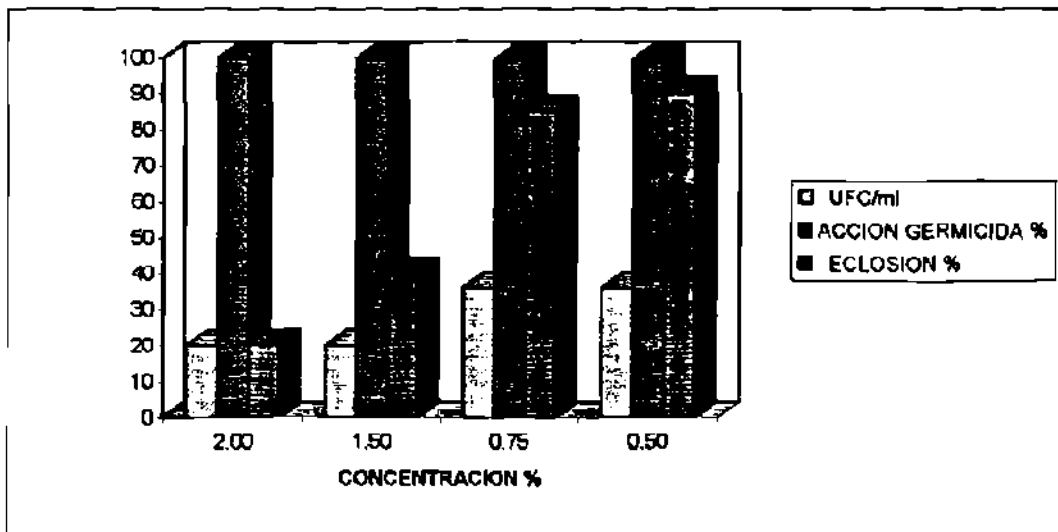


FIGURA 18

ACCION GERMICIDA DEL ALCOHOL ETILICO SOBRE LA FLORA BACTERIANA PRESENTE EN HUEVECILLOS DE *C. grandis* (AGUA DE ENJUAGUE) A UN TIEMPO DE EXPOSICION DE 60 SEGUNDOS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES.

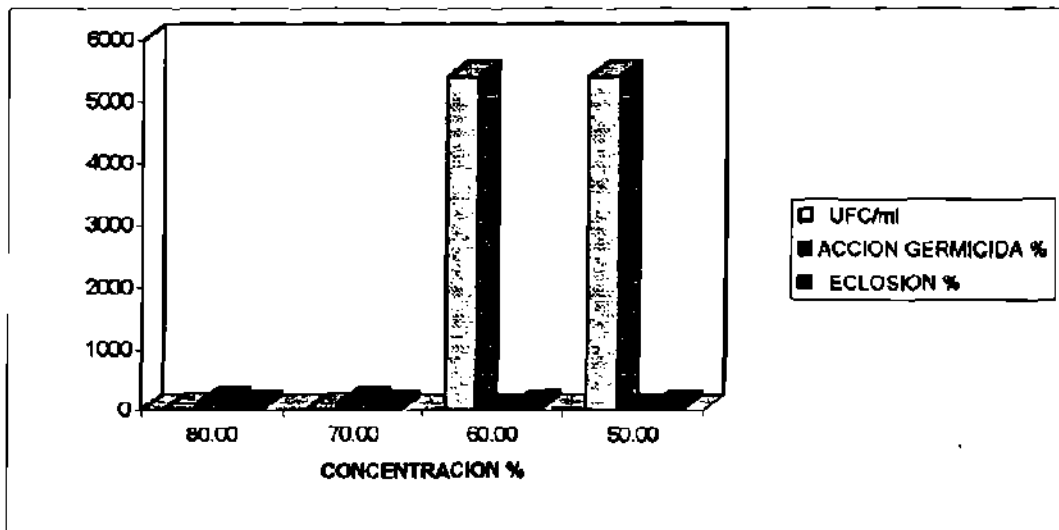


FIGURA 17

ACCION GERMICIDA DEL ALCOHOL ETILICO SOBRE LA FLORA BACTERIANA EN HUEVECILLOS DE *C. grandis* (AGUA DE ENJUAGUE) A UN TIEMPO DE 120 SEGUNDOS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES.

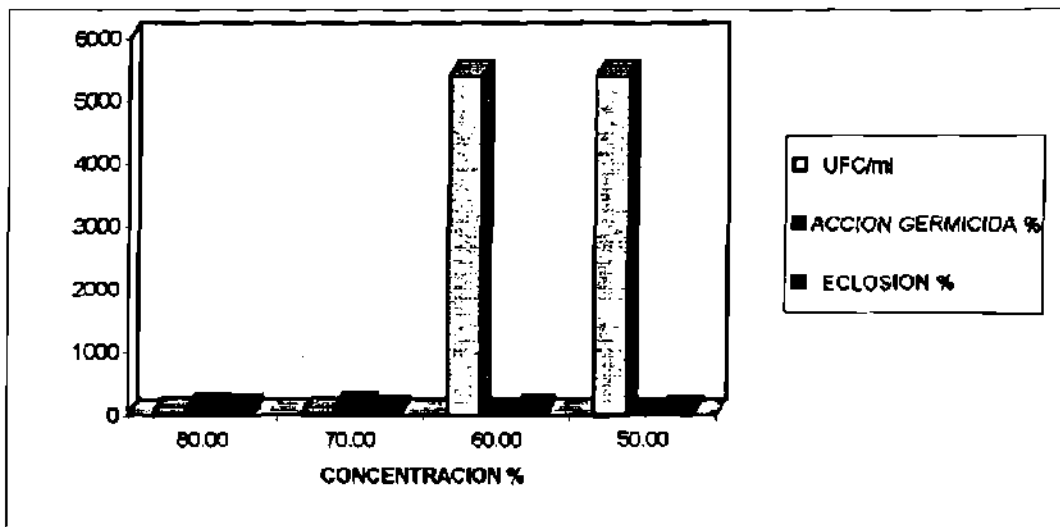
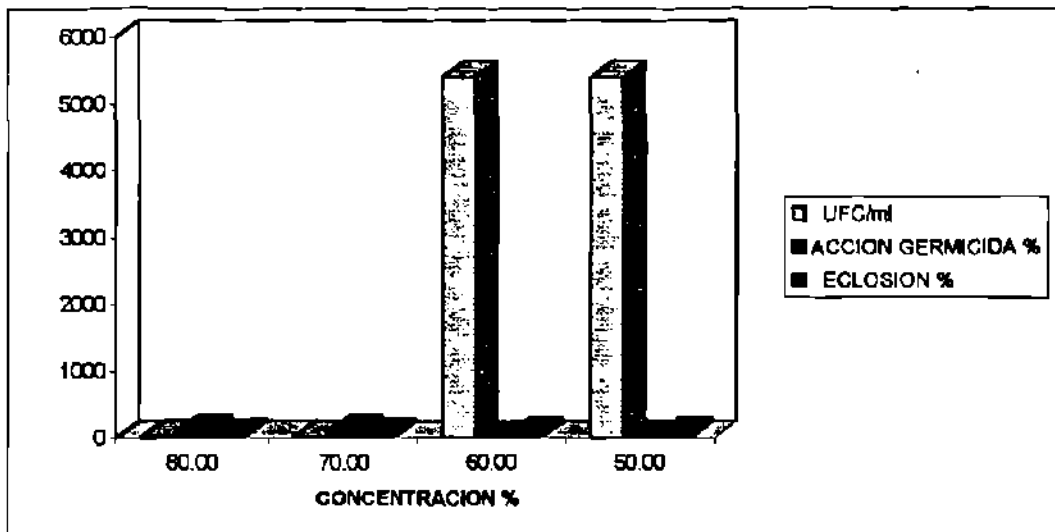


FIGURA 18

ACCION GERMICIDA DEL ALCOHOL ETILICO SOBRE LA FLORA BACTERIANA PRESENTE EN HUEVECILLOS DE *C. grandis* (AGUA DE ENJUAGUE) A UN TIEMPO DE EXPOSICION DE 180 SEGUNDOS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES.



7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De los microorganismos identificados en el sistema de cría masiva de *C. grandis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* y *Aeromonas hydrophila* han sido reportadas como patógenas a insectos y *Salmonella sp*, *Enterobacter agglomerans*, y *Serratia marcescens* como potencialmente patógenas a insectos. Hongos como *Aspergillus ochraceus*, *Metarrhizium sp.* y *Bauveria bassiana* identificados en este estudio son patógenos a insectos, *Aspergillus flavus*, *Penicillium sp.* y *Rhizopus sp.* son potencialmente patógenos a insectos. El mayor número de microorganismos se aisló de la dieta estándar y cámaras de emergencia.

Las bacterias *Pseudomonas spp.* y *Citrobacter sp.* están ampliamente distribuidas en el sistema de cría y fueron las que mostraron menor sensibilidad a la mayoría de los 12 antimicrobianos probados. Todas las bacterias aisladas fueron sensibles a Amikacina y Netilmicina.

La sustancia desinfectante de huevecillos que resultó más efectiva fué el yodo al 0.63% /1 minuto.

La utilización de dosis mínimas de conservadores, especialmente la combinación sorbato de potasio 0.032%-propionato de potasio 0.032% resultó ser más efectiva para el control de contaminación por microorganismos produciendo el más alto porcentaje de eclosión y emergencia de adultos, sin afectar el tiempo de desarrollo.

Tanto el dióxido de cloro como las sales cuaternarias de amonio (Timsen) fueron efectivos para el control de bacterias y hongos aislados en el sistema de cría de *C. grandis*. Las segundas requirieron dosis menores para ser efectivas. Benomil fué más efectivo que mancozeb para el control de hongos. Respecto al costo, los compuestos de cloro y mancozeb son más económicos que los compuestos cuaternarios de amonio y

benomil. Si se toma en cuenta la efectividad de estos últimos, tal vez deba considerarse el aspecto costo-beneficio.

La membrana de polietileno para uso en microondas resultó ser la más efectiva y mucho más económica que el parafilm y puede sustituirlo eficientemente como cubierta de las cámaras de cría.

Los resultados obtenidos en este estudio confirman la hipótesis propuesta en esta investigación que, postula que controlar la contaminación microbiana del sistema de cría masiva permite aumentar la eficiencia y reduce el costo de producción. Estos resultados son una contribución al conocimiento de la flora microbiana del sistema de cría de *Catolaccus grandis* y la forma de controlarla. Por lo anteriormente expuesto se recomiendan varias medidas, las cuales son necesarias para que el control de microorganismos sea efectivo destacando entre estas lo siguiente:

Equipo: Esterilización y saneamiento del equipo , utilización de sistema de flujo laminar con filtros de aire de alta eficiencia en áreas de preparación de medios de cultivo y de implante de huevecillos.

Personal: Selección y capacitación del personal en Microbiología y Entomología, control de acceso del personal y visitantes. Regulación sanitaria del personal, uso de bata, guantes, tapabocas, etc.

Sistema de cría: Esterilización de la superficie del huevecillo. Control sanitario de la dieta por medio de la utilización de conservadores en dosis mínimas combinado con la utilización de membranas para esterilizar nutrientes sensibles al calor. Monitoreo periódico de muestras y de organismos sospechosos para llevar a cabo un estricto control de calidad.

8. LITERATURA CITADA

- Avelino, H., R. Braga, R. P. Almida y C. Kramer. 1993. Biological control of the boll weevil. *Pesq. Agropec. Bras. Brascha.* 28: 257-261.
- Barnett, H.L. y L. Hunter. 1982. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi.* Mc. Millan Pub. Co. 218 p.
- Baumhover, A.H., W.W. Cantelo., J.M. Hobojold, C.M.Knott, C. y J. J. Lam, Jr. 1977. An improved method for mass rearing the tobacco hornworm. *U. S. Agric. Res. Serv. (Rep) ARS.-S-167.* 13pp.
- Bayer. 1986. *Plagas de los principales cultivos.* Bol. No. 8. p 8-10.
- Burke, H.R., W.E. Clark, J.R. Cate y P.A. Fryxell. 1986. Origin and dispersal of the bollweevil. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 32: 228-238.
- Cate, J.R. 1987. A method of rearing parasitoids of boll weevil without the host plant. *Southwest. Entomol.* 12: 211-215.
- Cate, J.R., P.C. Krauter y K.E. Godfrey. 1990. Pests of cotton, p 17-29. In: D.H. Habeck, F.D. Bennett and J.-H. Frank (eds). *Classical Biological Control in the Southern United States.* South Coop. Ser. Bull. 355.
- Cowan, S. T. y K. J. Steel. 1982. *Manual para la identificación de bacterias de importancia médica .* 2a ed. Ed. Continental. S.A. de C.V. México.
- Cross, W.H. y T.L. Chestnut. 1968. Arthropod parasites of the boll weevil *Anthonomus grandis* L. An Annotated list. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 64: 516-527.

- Edwards, P.R. y P. Edwing. 1972. Identification of Enterobacteriaceae. 3rd. ed. Burgess Pub. Co. 385p.
- Finegold, S.M. y W.J. Martin. 1983. Diagnóstico Microbiológico. 6a Ed. Médica Panamericana. México. 267p.
- Garza, Z. A. y A.A. Guerra. 1992. The role of basic nutrients in relation to the survival of boll weevil larvae to the parasitoid of one parasitoid. XIX International Congress of Entomology. Beijing, China. p 327.
- Giffawasen, C., B.R. Funke y F.I. Proshold. 1977. Control of antifungal -resistant strains of *Aspergillus niger* mold contaminants in insect rearing media. J. Econ Entomol. 68: 441-444.
- Guerra, A.A., S. Martinez y H.S. Del Río 1994. Natural and synthetic oviposition stimulants for *Catolaccus grandis* (Burks) females. J. Chem. Ecol. 20: 7-12.
- Guerra, A.A. 1992. In vitro rearing of *Bracon mellitor* and *Catolaccus grandis* with different insect hemolymph based diets. Southwest. Entomol. 17: 123-126.
- Guerra, A.A., K.M. Robacker y S. Martinez 1993. In vitro rearing of *Bracon mellitor* and *Catolaccus grandis* with artificial diet devoid of insect components. Entomol. Exp. Appl. 68: 303-307.
- Guerra, A.A. y A.Garza. 1978. Algae, an economical protein source for insect diets. Southwest. Entomol. 3: 76-79.
- Horton, D.L., G.R. Carner y S.G. Turnipseed. 1980. Pesticide inhibition of the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi* in soybeans. Environ. Entomol. 9: 304-308.

House, H. L. 1961. Insect nutrition . Ann. Rev. Entomol. 6: 13-26.

Hukuhara, T. 1985. Patology associated with cytoplasmic polyhedrosis viruses. pp 121-162. In: K. Maramorosh and K.E. Sherman (Eds). Viral Insecticides For Biological Control. Academic Press. Orlando Fla.

INIA. 1981. Folleto técnico 8. Centro de Investigaciones Agropecuarias.p 8-9.

King, E. G. y G. G. Hartley. 1992. Multiple species insect rearing in support of research and pest management. p 159-172. In: Advances in Insect Rearing for Research and Pest Management. T. E. Anderson y N. C. Leppla Eds. Westview press. Boulder, Col.

King, E. G. y J. E. Powell. 1992. Propagation and release of natural enemies for control of cotton insect and mite pests in the United States. Crop Protection Vol. 11. p 497-506.

King, E. G. 1993. Augmentation of parasites and predators for supression of arthropod pests . In: Conference Preceeding series R. D. Lumsden y J. L. Vaum. Eds. p 90-100.

King, E.G., R.J. Coleman, L. Woods, L. Wendel, S. Greenberg, A.W. Scott, J. Roberson and D.D. Hardee. 1995. Suppression of the boll weevil in commercial cotton by augmentative releases of a wasp parasite , *Catolaccus grandis* . pp 26-30. In: Addendum to the Proceedings . Beltwide Cotton Conferences 1995. National Cotton Council of America. Memphis, TN.

- Krieg, N.R. y Hold, J.G. 1984. *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*. 9th. ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore. 1085p.
- Leppia, N.C. y A.A. Guerra. 1989. Applications in biological control . p. 113-124. In; Special Conf. Proc. Entomol. Soc. Colomb. (SOCOLEN). Vol. 17, XVI Congress, Medellin, Colombia.
- Ludeman, L.R., B.R. Funke y C.E. Goodpasture. 1979. Mold control in insect rearing media.. Survey of agricultural fungicides and evaluation of the use of humectants. J. Econ. Entomol. 72: 579-582.
- Lyr, H. 1977. Mechanisms of action of fungicides. pp 239-261. In: Plant Disease. An Advanced Treatise. Vol. 1. How diseases are managed. Horsfall, J.G. y E.B. Cowley. Eds. Academic Press. New York.
- Majchrowicz , I. y T.J. Poprawsky. 1993. Effects "in vitro" of nine fungicides on growth of entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology* 3: 321-336.
- Martignoni , M.E. y J.E. Milstead. 1960. Quaternary ammonium compounds for the surface sterilization of insects. *J. Insect. Pathol.* 2: 124-133.
- Morales-Ramos, J.A. , K.R. Summy. J.L. Robertson, J.R. Cate y E.C. King. 1995 Feasibility of mass rearing *Catolaccus grandis*, a parasitoid of the boll weevil. pp 723-726. In: Proc. Beltwide Cotton Conference. National Cotton Council.
- Nettles, W. C. 1990. In vitro rearing of parasitoids: role of host factors in nutrition. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology.* 13: 167-175.

- Olmert, L. y R.G. Kenneth. 1974. Etude del influence de dix fongicides sur le pouvoir infectant des conidies d' *Entomophthora obscura* Hall et Dunn presentes a la surface d un sol non sterile. *Parasitica*. 35: 3-15.
- Poinar, G.O. y G.M. Thomas. 1978. *Diagnostic Manual for the Identification of Insect Pathogens*. Plenum Press. 218p.
- Raper, K.B. y D.I. Fennell. 1977. *The Genus Aspergillus*. Robert E. Krieger Pub. Co. 686p.
- SAGAR. 1995. *Censos del Centro de Estadistica Agropecuaria*.
- Shapiro, M. 1984. Microorganisms as contaminants and Pathogens in Insect Rearing. pp 130-142. In: E. G. King y N. C. Leppla. Eds. *Advances and Challenges in insect rearing*. USDA. ARS. Wash. D. C.
- Shapiro, J. P. 1986. Assimilation, Transport and Distribution of Molecules in Insects from Natural and Artificial Diets. pp 63-75. In: *Advances in Insect Rearing for Research and Pest Management*. T. E. Anderson y N. C. Leppla Eds.
- Singh, P. y G. E. Bucher. 1971. Efficacy of "safe" levels of antimicrobial food additives to control microbial contaminants in a synthetic diet for *Agria affinis* larvae. *Entomol. Exp. Appl.* 14: 297-309.
- Singh, P. y H. L. House. 1970. Antimicrobials "safe" levels in a synthetic diet of an insect *Agria affinis*. *J. Insect. Physiol.* 16: 1769-1782.
- Sikorowsky, P.P., A.D. Kent, O.H. Lindeg, G.W. Ygul y J. Robertson. 1980. Laboratory and insectary studies on the use of antibiotics and antimicrobial agents in mass-rearing of boll weevils. *J. Econ. Entomol.* 73: 106-110.

Sikorowsky, P.P. y A.M. Lawrence. 1994. Microbial contamination and insect rearing. *American Entomologist*. pp. 240-253.

Summy, K.R. , J.Morales Ramos y E.G. King. 1992. Ecology and potential impact of *Catolaccus grandis* (Burks) on boll weevil infestations in the Lower Rio Grande Valley . *Southwest. Entomol.* 17: 279-288.

Summy, K.R., J.A. Morales Ramos, E.G. King, D.A. Wolfenbarger, A.W. Scott y J.B. French. 1994. Integration of boll weevil parasite augmentation into the short-season cotton production system of the Lower Rio Grande Valley. pp 953-955. In: *Proc. Beltwide Cotton Conference* .National Cotton Council, San Diego, CA.

Thompson, S.N., 1975. Defined meridic and holidic diets and aseptic feeding procedures for artificially rearing the ectoparasitoid *Exeristes roborator* (Fabricius). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 68: 220.

Thompson, S. N. 1985. Metabolic integration during the host associations of multicellular animal endoparasites, *Comp. Biochem. Physiol.* 81B : 21-42.

Thompson, S. N. 1986. Nutrition and in vitro culture of insect parasitoids. *Ann. Rev. Entomol.* 31: 197-219.

Verna, L.C. y F.J. Herrero. 1952. *Micología*. Ed. El Ateneo. p 157.

Vinson, S.B. 1976. Host selection by insect parasitoids. *Ann. Rev. Entomol.* 21: 109-133.

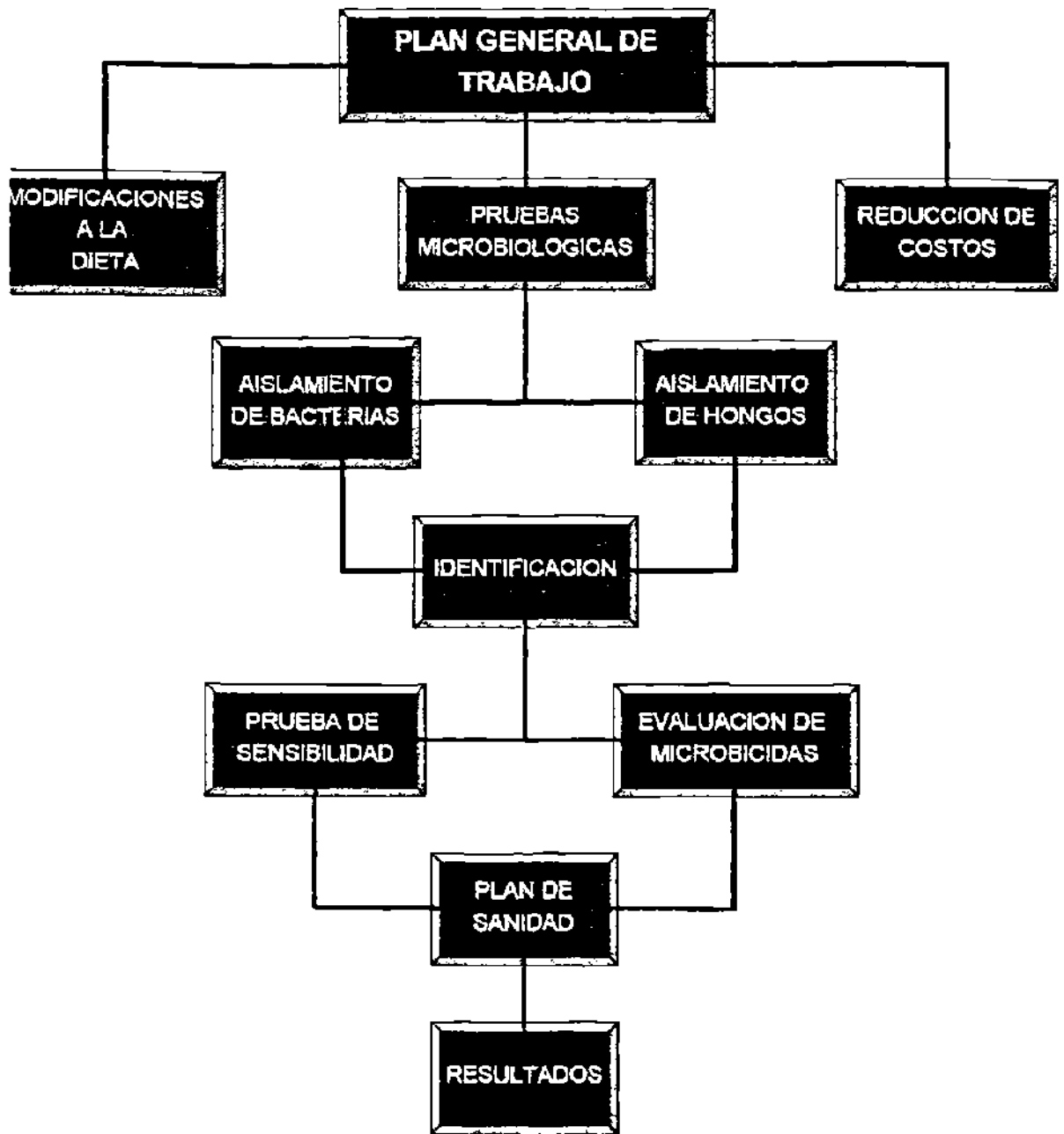
Yazlovetsky, I. G. 1986. Development of Artificial diets for Entomophagous Insects. by Understanding their Nutrition and Digestion. pp 41-62. In: Anderson, T.E. Leppla, N.C. (eds). Advances in Insect Rearing for Research and Pest Management. Westview Press, Boulder, Col.

APENDICE

Abreviaturas.....	85
Plan General de Trabajo.....	86
Metodología para Diferenciación Bioquímica de bacterias.....	87
Diagrama de flujo para identificación de bacterias.....	88
Diagrama de flujo para identificación de bacterias. Pruebas Bioquímicas.....	89
Diagrama de flujo para determinar sensibilidad a los antimicrobianos.....	90
Diagrama de flujo para identificación de hongos.....	91
Diagrama de flujo para evaluación de microbicidas en bacterias.....	92
Diagrama de flujo para evaluación de microbicidas en hongos.....	93
Resumen autobiográfico.....	94

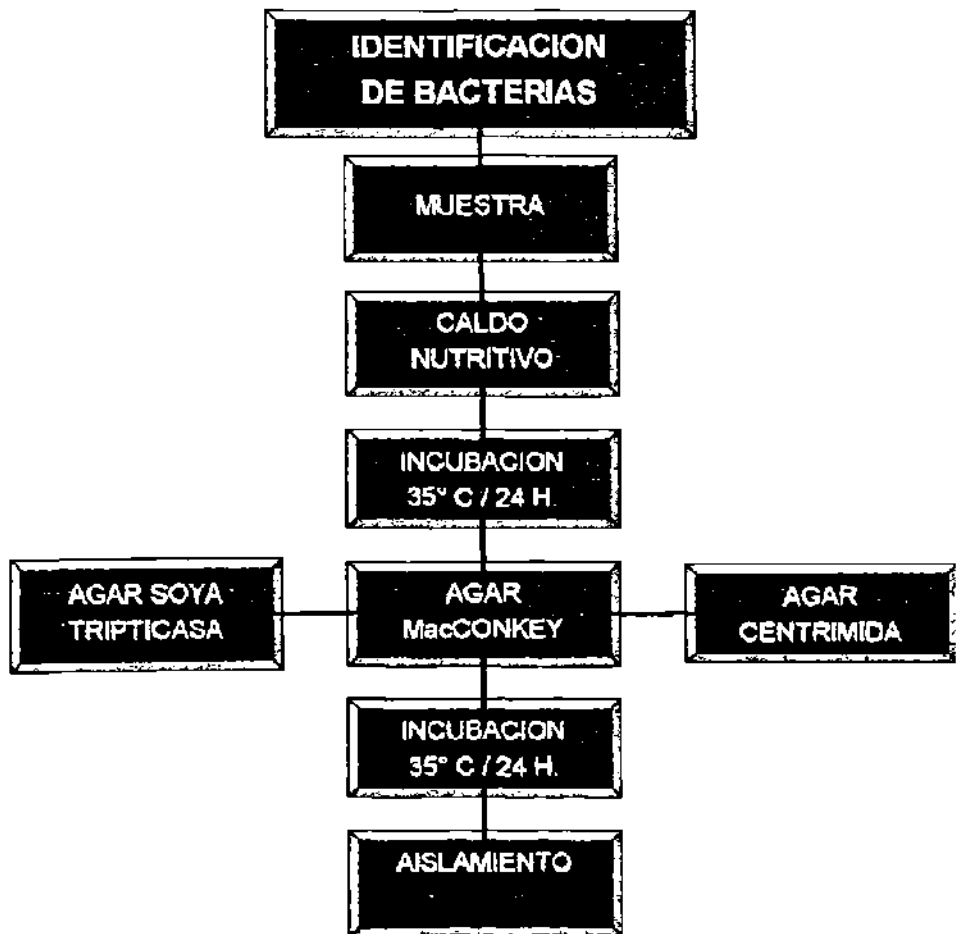
ABREVIATURAS

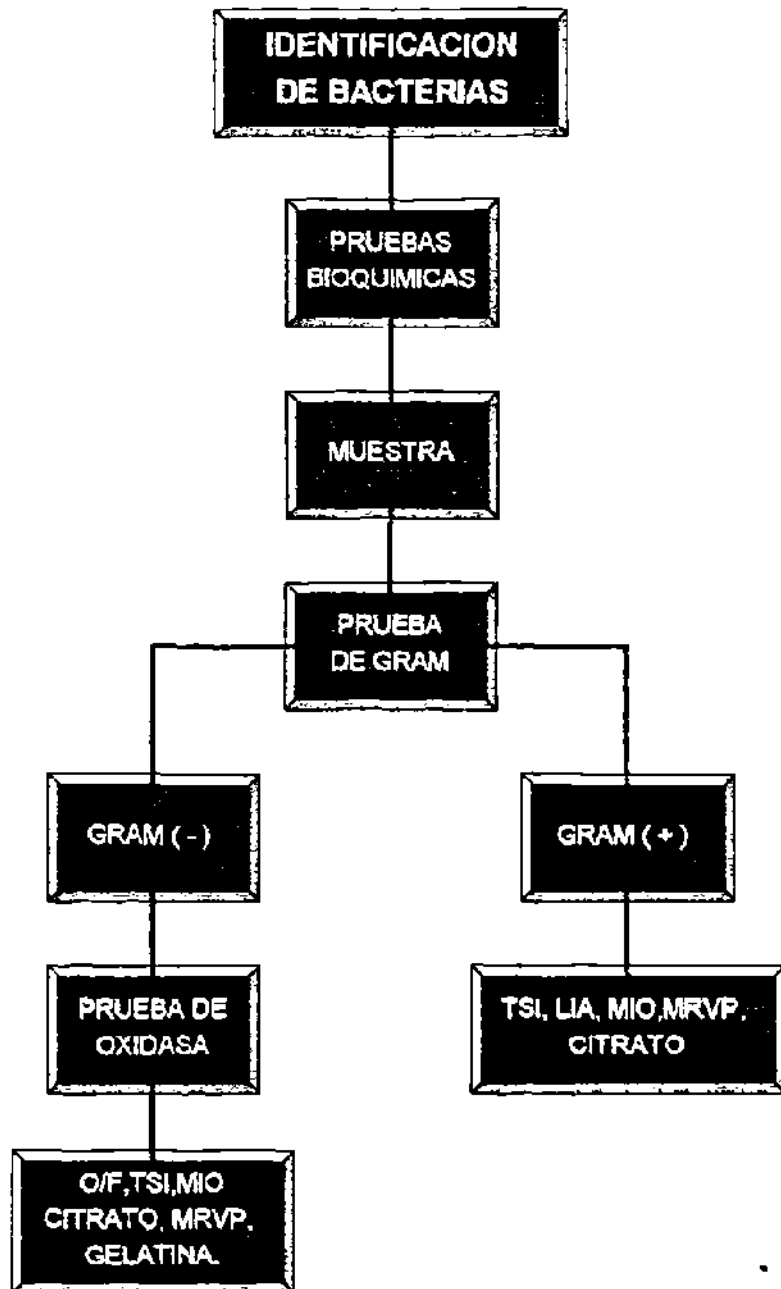
CCS	Caldo Caseína de Soya.
ACS	Agar Caseína de Soya.
AMC	Agar MacConkey.
APD	Agar Patata Dextrosa.
API 20E	Prueba rápida para Enterobacteriáceas oxidasa (-).
NFT	Prueba rápida para Enterobacteriaceas oxidasa (+).
CST	Caldo Soya Trypticasa.
AST	Agar Soya Trypticasa.
R	Resistente.
I	Intermedia.
S	Susceptible.
SXT	Trimetoprim.
AK	Amikacina.
AM	Ampicilina.
CB	Carbencilina.
CF	Cefalotina.
CRO	Ceftriaxona.
CL	Cloranfenicol.
GE	Gentamicina.
NET	Netilmicina.
NF	Nitrofurantoina.
PEF	Pefloxacina.
SDA	Agar Sabouroud Dextrosa.
CMI	Concentración mínima inhibitoria.
UFC	Unidades formadoras de colonia.
ppm	partes por millón.



**METODOLOGIA PARA
DIFERENCIACION BIOQUIMICA DE BACTERIAS**

DETERMINACION	MEDIOS DE CULTIVO Y/O REACTIVOS	TEMPERATURA Y TIEMPO DE INCUBACION (°C / hr.)	OBSERVACIONES
OXIDASA	CLORHIDRATO DE TETRAMETILFENILEN- DIAMINA		(+) PURPURA NEGRO
MOTILIDAD	MIO	35/24	CRECIMIENTO DIFUSO EN EL MEDIO
INDOL	1) MIO 2) CALDO TRIPTONA 3) SIM	35/24	(+) ANILLO PURPURA EN LA SUPERFICIE DEL MEDIO REACTIVO DE KOVAC'S
DESCARBOXILACION DE LA ORNITINA	MIO MR-VP/KOH + NAFTOL	35/24	(+) PURPURA (-) AMARILLO
PRODUCCION DE ACETIL-METIL-CARBINOL (ACETOINA)		35/24	(+) ROJO BRILLANTE EN LA SUPERFICIE
ROJO DE METILO	MR-VP/ROJO DE METILO (AC)	35/24	(+) ROJO (-) AMARILLO
REDUCCION DE NITRATOS	CALDO NITRATO/NAF- TILAMINA AC. SULFANILICO	35/24	(+) ROJO (-) AMARILLO
OXIDACION-FERMENTACION	MEDIO BASE OF HUGH LERFSON CON Y SIN ACEITE MINERAL MAS CARBOHIDRATO	35/24	(AMARILLO +/AMARILLO +) FERMENTATIVO (AMARILLO + / AZUL -) OXI- DATIVO (AZUL - / AZUL -) NO REAC- CION
UTILIZACION DE CITRATOS COMO UNICA FUENTE DE CARBONO	AGAR CITRATO DE SIMMONS	35/24	(+) AZUL (-) VERDE
HIDROLISIS DEL ALMIDON	AGAR ALMIDON	35/24	(+) ZONA CLARA ALREDE- DOR DE LA ESTRIA
HIDROLISIS DE LA GELATINA	GELATINA NUTRITIVA	35/24	(+) MEDIO LIQUIDO (-) MEDIO SOLIDO
ACCION SOBRE LOS CARBOHIDRATOS	1) TSI	35/24	1) K/A ALCALINO/ACIDO K/N ALCALINO/NEUTRO A/A ACIDO/ACIDO
	2) CALDO PURPURA DE BROMOCRESOL + 1% DEL CARBOHIDRATO (GLUCOSA, SACAROSA, LACTOSA MALTOSA Y MANITOL)	35/24	2) (+) ACIDO AMARILLO (+) GAS BURBUJA
DESCARBOXILACION DE LA LISINA	LIA	35/24	K/A ALCALINO/ACIDO K/N ALCALINO/NEUTRO (+) ROSA (-) AMARILLO
PRODUCCION DE H ₂ S	TSI	35/24	(+) NEGRO
CRECIMIENTO A 4 Y 42 °C	CALDO SOYA TRIPTICASA	4 Y 42/24	(+) TURBIDEZ EN EL MEDIO (-) TRANSPARENCIA EN EL MEDIO





**PRUEBA DE
SENSIBILIDAD**

**CEPA
BACTERIANA**

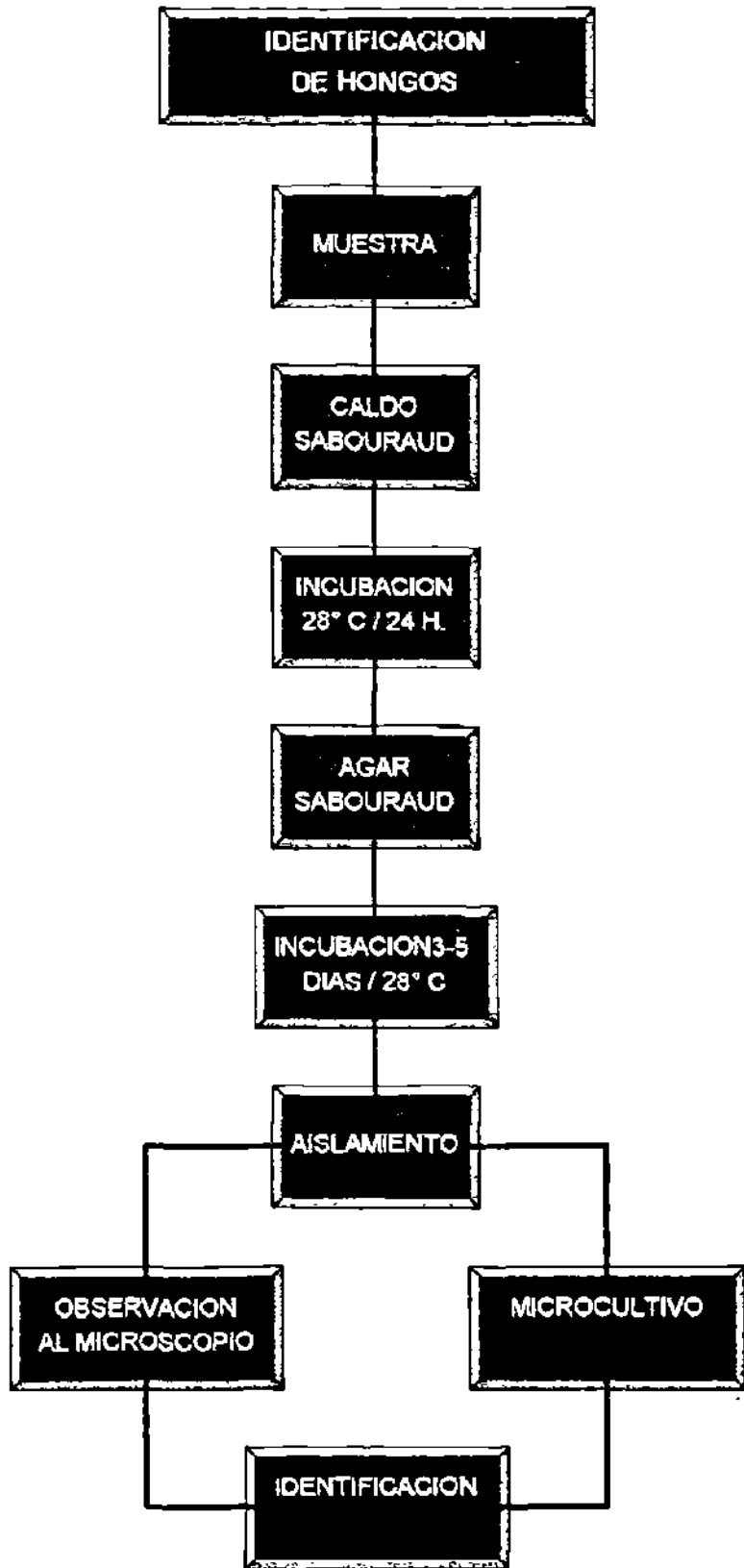
**CALDO
CASOY**

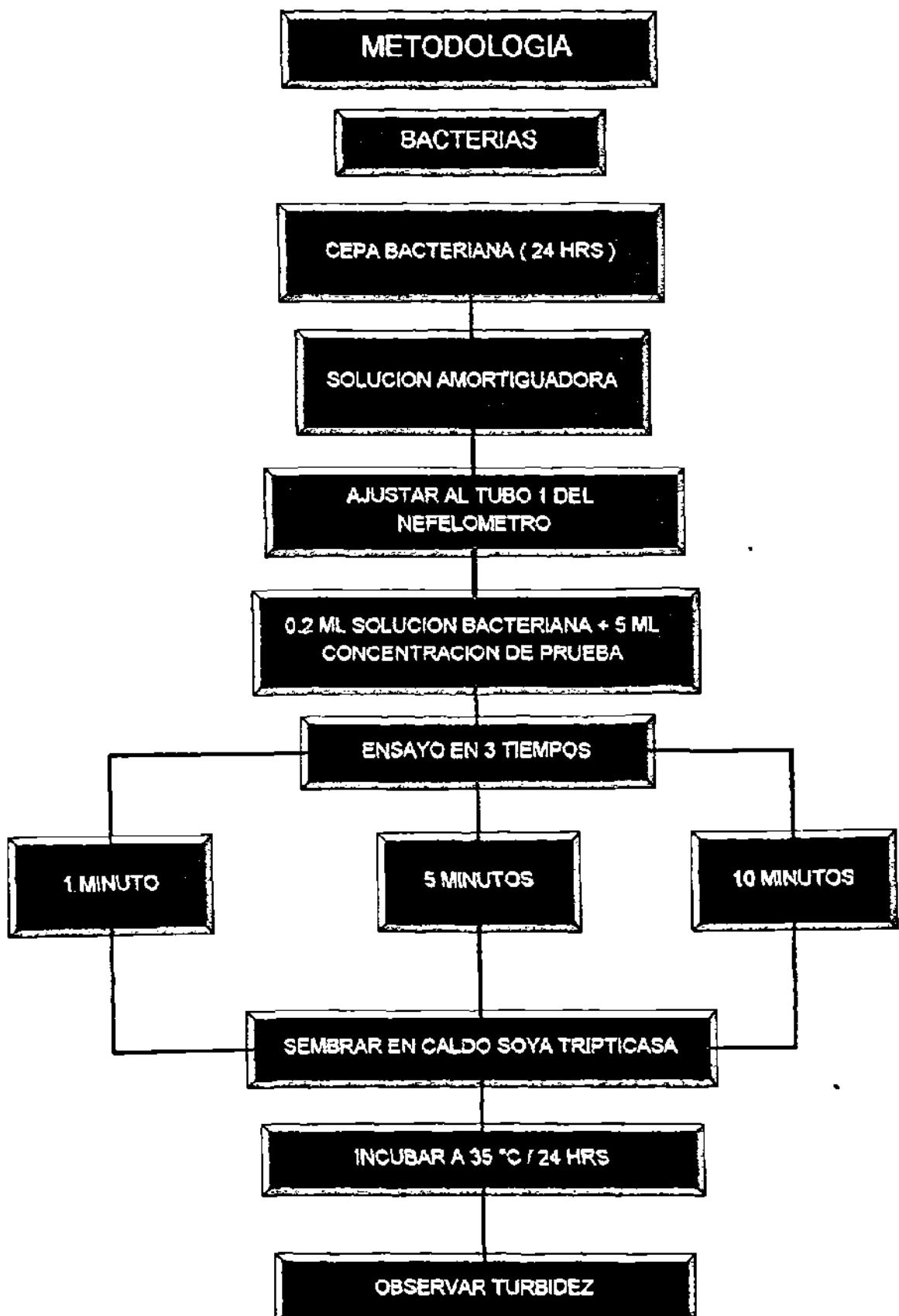
**INCUBACION
35° C / 2 H.**

**AGAR CASOY
(SIEMBRA DE BACTERIAS)
COLOCACION DEL SENSIDISCO**

**INCUBACION
35° C / 18 H.**

**MEDICION DE
ZONAS DE
INHIBICION**





METODOLOGIA

HONGOS

SUSPENSION DE ESPORAS +
SOLUCION AMORTIGUADORA

CUENTA EN CAMARA
CUENTACELULAS

MEDIO DE CULTIVO SDA +
SOLUCION DEL PRODUCTO
DE PRUEBA

HOMOGENIZAR

VACIAR A CAJAS PETRI

INOCULACION 0.1 ML / CAJA

INCUBACION 28° C + - 2° C /
3, 5, 7, 14 DIAS

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

María de la Paz Tijerina Garza.

Candidata para el grado de Doctor en Ciencias Agrícolas, con especialidad en Parasitología de Postcosecha.

Tesis:

Implementación de un Sistema de Cría Masiva "*in vitro*" de los Ectoparasitoides de *Anthonomus grandis* y *Anthonomus eugermi*.

Areas de Estudio:

Agronomía (Parasitología de Postcosecha y Control Biológico).

Biografía

Datos Personales:

Nacida el 5 de Octubre de 1943 en Monterrey, N.L. Hija de María Enoé Garza Hernández y Francisco Tijerina Saldaña.

Educación:

- I) Egresada de la Facultad de Ciencias Biologicas, de la Universidad Autonoma de Nuevo Leon, como Químico Bacteriólogo Parasitologo, en Diciembre de 1979.
- II) Egresada de la División de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, como Maestra en Ciencias con Especialidad en Parasitología en Junio de 1987.

Experiencia Profesional:

- I) Maestra y encargada del laboratorio de Biología, Universidad Regiomontana 1979-1992.
- II) Maestra de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, desde 1981 a la fecha.
- III) Investigadora en el área de Protozoología, en la Facultad de Ciencias Biologicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Otros:

- I) Publicaciones científicas en revistas nacionales y extranjeras, y Memorias de Congresos Nacionales.



