

## REHIDRATACIÓN Y DISGREGACIÓN MECÁNICA DEL RESERVORIO DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS STEINERNEMA GLASERI PARA SU LIBERACIÓN

### REHYDRATION AND MECHANICAL DISINTEGRATION OF THE ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE RESERVOIR STEINERNEMA GLASERI FOR RELEASE

Franco Luján Víctor Alberto<sup>1</sup>, Martínez Vargas Adrián<sup>2</sup>, Cruz Martínez Heriberto<sup>3</sup>,  
Ramírez Arellanes Samuel<sup>4</sup>, Ruiz Vega Jaime<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Doctor en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales. Instituto Tecnológico del Valle de Etlá, [victor.fl@itvalletla.edu.mx](mailto:victor.fl@itvalletla.edu.mx), Tel. (951) 305 2927, Abasolo S/N, Barrio del Agua Buena, Santiago Suchilquitongo, Oaxaca 68230, México.

<sup>2</sup>Maestro en Educación. Instituto Tecnológico del Valle de Etlá, [martinezvargasadrian@gmail.com](mailto:martinezvargasadrian@gmail.com), Tel. (951) 305 2927, Abasolo S/N, Barrio del Agua Buena, Santiago Suchilquitongo, Oaxaca 68230, México.

<sup>3</sup>Doctor en Ciencias en Nanociencias y Nanotecnología. Instituto Tecnológico del Valle de Etlá, [heriberto.cm@itvalletla.edu.mx](mailto:heriberto.cm@itvalletla.edu.mx), Tel. (951) 305 2927, Abasolo S/N, Barrio del Agua Buena, Santiago Suchilquitongo, Oaxaca 68230, México.

<sup>4</sup>Maestro en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales. Instituto Tecnológico del Valle de Etlá, [samuel.ra@itvalletla.edu.mx](mailto:samuel.ra@itvalletla.edu.mx), Tel. (951) 305 2927, Abasolo S/N, Barrio del Agua Buena, Santiago Suchilquitongo, Oaxaca 68230, México.

<sup>5</sup>Doctor en Ciencias en Agroclimatología. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca, [jvega@ipn.mx](mailto:jvega@ipn.mx), Tel. (951) 517 0610 Ext. 82787, Hornos No. 1003, Col. Noche Buena, Municipio de Santa Cruz Xoxocotlán C.P. 71230. Oaxaca, México.

**Resumen** – Los reservorios con nematodos entomopatógenos (NEPs) han demostrado ser una alternativa viable para el almacenamiento y supervivencia de éstos; sin embargo, un inconveniente es su liberación de dichos reservorios. Por lo tanto, este trabajo tiene como objetivo evaluar el nivel de rehidratación y la disgregación mecánica del reservorio para la liberación de NEPs *Steinernema glaseri*. El nivel de rehidratación se realizó mediante seis tiempos de permanencia de los reservorios (0, 10, 20, 30, 40 y 50 s) en una cámara nebulizadora. Posteriormente, se determinó la capacidad de absorción máxima de agua y la cohesión microestructural del reservorio en función del nivel de rehidratación. La disgregación mecánica se evaluó con cuatro energías potenciales de 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 m. Por último, la infectividad de los NEPs liberados del reservorio se evaluó con larvas del último instar de *Galleria mellonella*. Los resultados mostraron que el reservorio necesita un nivel de rehidratación mayor a 326.2 µL de agua para comenzar su disgregación, teniendo una capacidad de absorción máxima de agua del 90.90%. La cohesión microestructural del reservorio sin rehidratar fue 711 Pa, la cual se incrementó con el nivel de rehidratación, alcanzando un valor máximo de 796 Pa. Así mismo las energías de 0.6 y 0.8 m fueron capaces de lograr una disgregación mecánica del reservorio. Un nivel de rehidratación de 326.2 µL con una energía de disgregación mecánica de 0.6 m provocó la liberación del 100% de NEPs, los cuales lograron una infectividad máxima del 95% sobre larvas de *Galleria mellonella*. Los resultados de esta investigación muestran la viabilidad del uso de reservorios para la aplicación de los NEPs como agentes de control biológico.

**Palabras Clave:** liberación, nemátodos, infectividad, patogenicidad.

**Abstract** – Reservoirs with entomopathogenic nematodes (EPNs) have shown to be a viable alternative for their storage and survival; however, one disadvantage is their release from such reservoirs. Therefore, this work aims to evaluate the level of rehydration and mechanical disintegration of the reservoir for the release of EPNs *Steinernema glaseri*. The level of rehydration was achieved using six permanency times of reservoirs (0, 10, 20, 30, 40, and 50 s) in a nebulizer chamber. Subsequently, the maximum water absorption capacity and the microstructural cohesion of the reservoir were determined based on the level of rehydration. The mechanical disintegration was evaluated with four potential energies of 0.2, 0.4, 0.6, and 0.8 m. Finally, the infectivity of the EPNs released from the reservoir were evaluated on *Galleria mellonella* last instar larvae. The results showed that the reservoir needs a level rehydration higher than 326.2 µL of water to begin its disintegration, having a water absorption capacity of 90.90%. The microstructural cohesion of the unhydrated reservoir was 711 Pa, which increased with the level of rehydration, reaching a maximum value of 796 Pa. Likewise, the energies of 0.6 and 0.8 m were able to achieve a mechanical disintegration of the reservoir. A level rehydration of 326.2 µL with a mechanical disintegration energy of 0.6 m caused the EPNs release of 100%, which achieved a maximum infectivity 95% about *Galleria mellonella*. The results of this research show the feasibility of using reservoirs for the application of NEPs as biological control agents.

**Key words** – Release, nematodes, infectivity, pathogenicity

#### INTRODUCCIÓN

La exigencia de cultivos con rendimientos cada vez mayores, el aumento en las utilidades de la producción

agrícola y las previsiones de una producción insuficiente de alimentos han encaminado al uso indiscriminado y excesivo de pesticidas químicos para el control de plagas [1]. Los problemas ambientales asociados al uso de pesticidas como consecuencia de su persistencia en el tiempo y su no biodegradación ocasiona que se acumulen en el suelo, filtrándose hacia las aguas subterráneas y contaminándolas. Así mismo, las plagas tienden a aumentar su resistencia, mitigando la población de los organismos no objetivo como insectos benéficos y favoreciendo la proliferación de plagas secundarias [2, 3]. En esta dirección, un método amigable con el medio ambiente para la mitigación de plagas es el control biológico que dentro de sus ventajas se encuentran: la nula resistencia de las plagas al agente de control, no existen problemas con intoxicaciones y la relación costo/beneficio es redituable [4, 5].

El control biológico hace uso de una amplia gama de organismos, entre los que se incluyen los nemátodos entomopatógenos (NEPs); sin embargo, su uso no se ha generalizado para el control de plagas agrícolas debido a diversas limitantes para su reproducción masiva y baja supervivencia en condiciones de almacenamiento [6]. Por lo que diversas formulaciones de NEPs han sido desarrolladas con la finalidad de conservarlos por periodos de tiempo más amplios, dentro de las cuales se encuentran las esponjas, soluciones acuosas, formulación en cadáveres o en insectos de cuerpo duro [7, 8].

Un avance en la tecnología de formulación fue el desarrollo de reservorios de material granular, como una protección de los NEPs ante los factores abióticos del medio ambiente como son los rayos UV, la humedad ambiental y la temperatura [9]. La manufactura de reservorios con NEPs se ha realizado mediante una producción mecánica [10] la cual ha demostrado mejorar la estabilidad y tiempo de supervivencia de NEPs de la especie *Steinernema glaseri*, los cuales han presentado resultados favorables para el control de diversas plagas [11] entre ellas la gallina ciega (*Phyllophaga vetula*) que afecta a los cultivos del maíz [12]. A pesar de los avances en la formación de reservorios granulares para NEPs, aún falta un procedimiento adecuado y eficiente para la liberación de los NEPs de dicho reservorio. En este contexto, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar el nivel de rehidratación (NR) y la disgregación mecánica (DM) del reservorio para la liberación de NEPs *S. glaseri*.

## DESARROLLO

### Materiales

Los nematodos entomopatógenos *S. glaseri* utilizados fueron proporcionados por el laboratorio de entomología de la Universidad de California campus Davis, los cuales han sido constantemente reproducidos a través del método propuesto por Kaya y Stock, [13] utilizando larvas del último instar del *Galleria mellonella* como

hospedero. Para esta investigación, se emplearon NEPs *S. glaseri* con una edad no mayor a 14 días y almacenados en agua bidestilada a una temperatura de  $11 \pm 1$  °C previo a su formulación. El material granular para la formulación de los NEPs fue tierra de diatomeas (TD) Celite® 209, el cual es idóneo para el encapsulamiento de organismo vivos [9].

### Formulación de los NEPs

La manufactura de los reservorios para los NEPs se realizó con base en lo propuesto por Matadamas et al. [10] empleando una máquina encapsuladora de NEPs, la cual se operó con los siguientes parámetros: velocidad de rotación del disco compactador de 87 rpm, ángulo de inclinación del compactador de 35.7° y un tiempo de permanencia de 90 s del reservorio en el disco de compactación.

Se empleó agua bidestilada como componente únicos de la solución acuosa con una dosificación de  $1000 \pm 50$  NEPs *S. glaseri* en  $200 \pm 5$  µL de agua bidestilada [14].

### Nivel de rehidratación del reservorio

La prueba de rehidratación se realizó en una cámara nebulizadora de 50 x 50 x 50 cm que tiene dos pistolas de aspersión con diámetro de boquilla de 1 mm y una presión de operación 0.061 – 0.12 MPa, para arrojar gotas de agua con un diámetro de 50 – 100 µm. Sobre la cámara se montó una balanza analítica OHAUS® con una presión de 0.01 g, a la cual se le fijó un anillo metálico de Ø10 mm y sobre éste se colocó el reservorio. El nivel de rehidratación (NR) se basó en el tiempo de permanencia del reservorio en la cámara nebulizadora, los cuales fueron de 0, 10, 20, 30, 40 y 50 s, donde la balanza registro la masa del reservorio antes y después de la rehidratación.

Una vez que el reservorio fue retirado de la cámara nebulizadora, éste se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 90 minutos [15]. Posteriormente, se registró la masa del reservorio rehidratado y la capacidad de absorción máxima de agua (CA) se determinó mediante la ecuación 1.

$$CA = \frac{W}{W_0} - 1 \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde:

CA = capacidad de absorción máxima de agua (%).

W = masa del reservorio rehidratado (g).

W<sub>0</sub> = masa del reservorio sin rehidratar (g).

### Cohesión microestructural del reservorio

Un reservorio se rehidrató en la cámara nebulizadora durante los tiempos previamente mencionados e inmediatamente después se colocó en una celda Jenike modificada. Con dicha celda se determinó la fuerza necesaria para que el reservorio fallará por esfuerzo

cortante. Posteriormente, la cohesión microestructural del reservorio (CM) se calculó con base en la ecuación 2.

$$CM = \frac{F}{A_T} \quad \text{Ec. (2)}$$

Donde:

CM = Cohesión microestructural (Pa)

F = Fuerza necesaria para el reservorio falle por esfuerzo cortante (N)

A<sub>T</sub> = Área de la sección transversal del reservorio (m<sup>2</sup>)

### Disgregación mecánica del reservorio

La prueba de disgregación mecánica se realizó con base en la metodología propuesta por Jinsheng Fu et al. [16] que consistió en proporcionar cuatro energías potenciales de 0.20, 0.40, 0.60 y 0.80 m al reservorio para posteriormente dejarlo caer a un suelo agrícola seco cuya granulometría fue: 90.4% de arena, 5% de limo y 4.6% de arcilla. Antes y después de la prueba se determinó la masa del reservorio en una balanza analítica marca OHAUS® con una sensibilidad de 0.01 g. Posteriormente, la relación de disgregación mecánica (DM) se determinó con la ecuación 3:

$$DM = \frac{M}{M_0} \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde

DM = Disgregación mecánica

M = Masa del reservorio después de la prueba (g)

M<sub>0</sub> = Masa del reservorio antes de la prueba (g)

### Emergencia de los NEPs

Reservorios a los cuales se les aplicaron pruebas de rehidratación y disgregación mecánica fueron puestos en una caja Petri en cuyo interior se colocó papel filtro Whatman No 1 humedecido con 1 mL de agua bidestilada. Los NEPs que lograron emerger del reservorio se deslizaron por el papel filtro y la caja Petri se llevó a un microscopio estereoscópico para contabilizar los NEPs liberados mediante el método propuesto por Chen y Glazer, [17].

### Evaluación de la infectividad de los NEPs liberados.

La prueba de infectividad consistió en colocar un reservorio con la menor energía para lograr una DM significativa en una trampa White para posteriormente ser rehidratado con tres diferentes niveles. Junto con el reservorio se introdujo una larva de *G. mellonella*. Después de 72 h las larvas que murieron fueron retiradas y colocadas en una caja Petri para verificar que su muerte haya ocurrido a causa de los NEPs.

### Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un ANOVA y las diferencias significativas con la prueba de Tukey. Lo anterior empleando el software SPSS®.

## DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### Rehidratación y capacidad de absorción del reservorio de NEPs

En la Figura 1a se observa el NR de reservorio en función del tiempo de permanencia en la cámara nebulizadora, donde el NR incrementa con el transcurso del tiempo. La Figura 1b ilustra el efecto del NR en la masa del reservorio. Los resultados indican que la masa del reservorio aumenta con el NR hasta alcanzar una masa máxima de 0.65 g con un NR de 326 μL. Posteriormente, el aumento en el NR produce una pérdida de masa en el reservorio debido a que éste se satura comportándose como un fluido [18] y por consiguiente ocurre la disgregación por rehidratación del reservorio llegando a tener una masa de 0.25 g y 0.05 g para los NR de 470 y 625 μL, respectivamente.

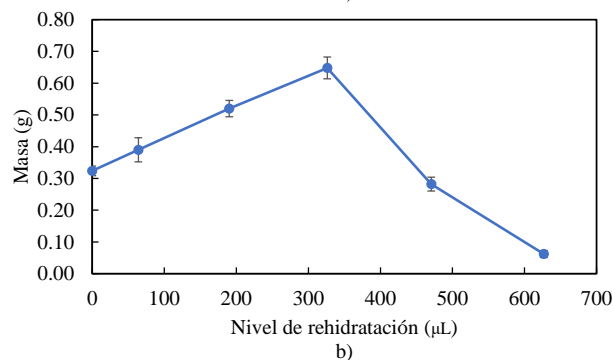
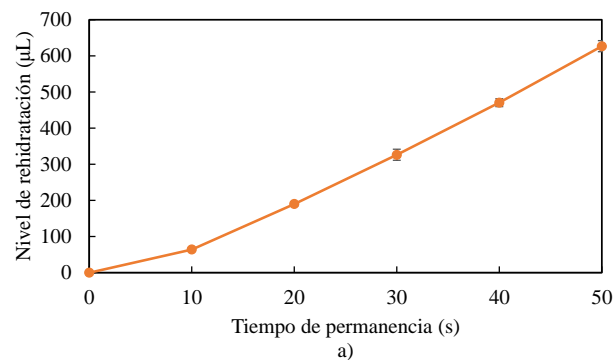


Figura 1. a) Nivel de rehidratación del reservorio con base en el tiempo de permanencia en la cámara nebulizado y b) efecto del nivel de rehidratación en la masa del reservorio.

La masa inicial y final antes de la disgregación por rehidratación y la CA del reservorio son presentados en la Tabla 1. Los resultados indican que el reservorio de NEPs es capaz de absorber una cantidad significativa de agua respecto a su masa, lo cual es debido a que esta manufacturado con TD que es un material arcilloso capaz

de absorber y adsorber agua. No obstante, Picasso, [19] menciona que es la absorción el principal fenómeno para la retención de agua.

Si bien la CA del reservorio es cercana al 100%, es importante mencionar que su masa es tan solo de 31 g; por lo tanto, la cantidad de agua absorbida por éste es del orden de los microlitros, cantidad de agua que puede ser encontrada en diversos suelos agrícolas durante la temporada de lluvias [20-22].

Tabla 1. Capacidad de absorción máxima de agua del reservorio de NEPs.

Masa inicial (g)	D.E.	Masa Final (g)	D.E.	CA (%)
0.32	0.02	0.65	0.03	90.90
D.E. = Desviación estándar; CA = Capacidad de absorción máxima de agua				

### Cohesión microestructural de reservorio de NEPs

El efecto del nivel de rehidratación de la cohesión microestructural (CM) del reservorio es mostrado en la Figura 2, donde las medias que no comparte una letra son significativamente diferentes.

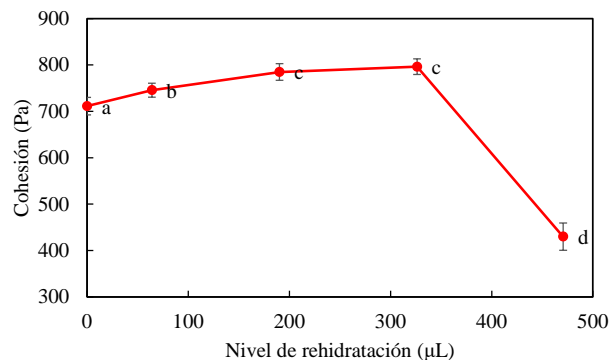


Figura 2. Cohesión microestructural del reservorio en función del nivel de rehidratación.

Es importante señalar que el comportamiento de la CM es semejante a la disgregación por rehidratación del reservorio, ambas consecuencia del material arcilloso con el cual está elaborado dicho reservorio. La cohesión de un material arcilloso se incrementa hasta un máximo y luego decrece rápidamente al ir aumentando el contenido de humedad en éste [23]. Lo anterior es debido a que la cohesión es función del espesor de la película de agua, conocida como “film”, que rodean a las partículas arcillosas del reservorio. La teoría del film menciona que un exceso de agua en los materiales arcillosos provoca el incremento del grosor del film, ocasionando un aumento de las cadenas de puentes de hidrogeno y por ende el espacio entre las partículas de arcilla [24], motivo por el cual la masa del reservorio incrementa, tal como mostr

los resultados de rehidratación. Conforme el reservorio sigue rehidratando, la capa de agua ocasiona un deslizamiento de las partículas arcillosas, y por consiguiente la masa del reservorio se vuelve viscosa y la CM entre ellas decrece rápidamente hasta ocasionar una disgregación por rehidratación.

Los resultados anteriores indican que el reservorio de NEPs necesita una cantidad de agua semejante a la de su propia masa para que la CM del reservorio decrezca, su estructura falle y finalmente se disgregue por rehidratación.

### Disgregación mecánica

La Figura 3 ilustra los resultados de la relación de disgregación mecánica (DM) del reservorio donde las medias que no comparte letra son significativamente diferentes.

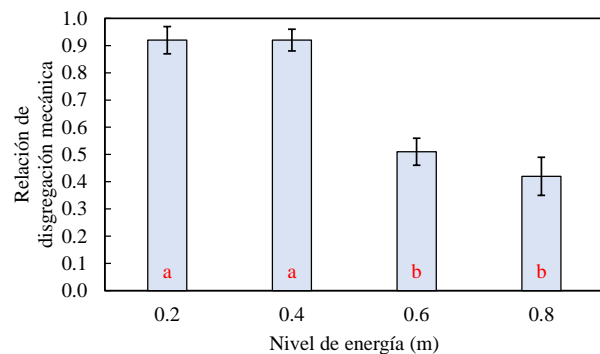


Figura 3. Relación de disgregación mecánica del reservorio de NEPs

Los resultados indican que para una energía de 0.2 y 0.4 m, la DM de reservorio es cercano a uno, es decir, que éste permaneció prácticamente sin alterar. Para las energías de 0.6 y 0.8 m, las DM del reservorio fueron significativamente diferentes en comparación de las energías de 0.2 y 0.4 m; no obstante, semejantes entre ellas. Lo anterior indica que para lograr una DM del reservorio de NEPs es necesario una energía mínima de 0.6 m, que en la práctica puede ser aplicada al ser una cantidad menor a la altura promedio de un ser humano.

Una vez conociendo las cantidades de NR y DM necesarias para ocasionar una falla de la estructura del reservorio, es preciso conocer el efecto de la interacción de ambas sobre la liberación de los NEPs. Dichos resultados se presentan a continuación.

### Emergencia de los NEPs

La Tabla 2 muestra los porcentajes de NEPs que emergieron del reservorio con la interacción de la disgregación por rehidratación y DM. Los datos indican que en un reservorio sin rehidratación la emergencia de los NEPs es nula. Cuando el NR incrementa de 0 a 326 µL el porcentaje de NEPs también aumenta. Sin embargo, cuando el reservorio sigue rehidratándose el número de

NEPs liberados decrece. Lo anterior puede ser debido al aumento en la CM y el posterior comportamiento plástico de reservorio, los cuales pueden dificultar la movilidad y posterior emergencia de los NEPs.

Tabla 2. Porcentaje de NEPs liberados del reservorio debido a su NR y DM.

Nivel de rehidratación (μL)	Disgregación mecánica (m)			
	0.2	0.4	0.6	0.8
0	0	0	0	0
64	37	33	32	39
190	45	49	46	50
326	77	91	100	97
470	51	85	56	39
626	55	58	52	54

Continuado con el análisis, la interacción de la rehidratación con la DM provoca diversos resultados en la liberación de los NEPs, siendo aquella con un NR de 326 μL y energía de 0.6 m la que induce un 100% NEPs emergidos. No obstante, cuando el NR incrementa a más de 326 μL y en combinación con cualquier DM la emergencia de NEPs decrece a porcentaje cercano al 50%. Estos dos mecanismo para la liberación de NEPs de reservorios granulares presentan mejores resultados que otras formulaciones; por ejemplo, diversas investigaciones de NEPs formulados en gel han reportado problemas para la liberación debido a las dificultades para la disolución de dichos geles [25].

Los resultados obtenidos muestran la viabilidad del uso de reservorios con NEPs para su liberación; no obstante, se debe de tener en cuenta que el factor principal es la rehidratación.

#### Infectividad de los NEPs liberados del reservorio

Para la pruebas de infectividad se tomó en cuenta los NR de 64, 326 y 626 μL junto con una energía de 0.6 m para la DM y los resultados son mostrados en la Figura 4.

Los datos indican que el mayor porcentaje de infectividad fue cuando el reservorio tuvo un NR de 326 μL y una DM de 0.6 m, lo cual concuerda con los resultado de liberación de NEPs, ya que la combinación de estos factores ocasiono la mayor emergencia de *S. glaseri*. El mismo nivel de DM y una rehidratación de 626 μL producen una infectividad del 60%, mientras que una rehidratación de 64 μL logra una infectividad máxima del 50%.

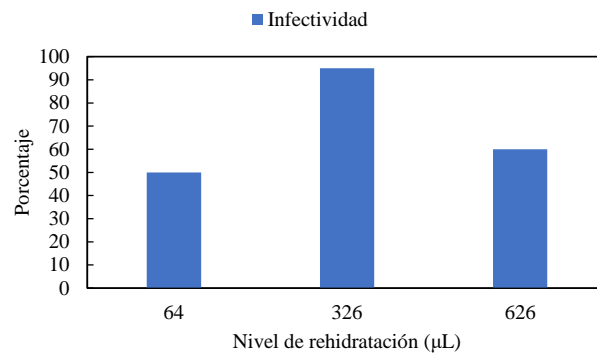


Figura 4. Infectividad de los NEPs *S. glaseri* emergidos del reservorio.

Los resultados de la presente investigación muestran que la rehidratación y la disgregación mecánica del reservorio no afecta negativamente la infectividad de los NEPs; por lo tanto, se puede afirmar que la formulación mediante materiales granulares es una opción viable para el almacenamiento, transporte y aplicación de *S. glaseri* como agentes de control biológico.

#### CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en la investigación, las siguientes conclusiones pueden ser mencionadas.

- La disgregación por rehidratación del reservorio de NEPs se logra con un nivel de rehidratación mayor de 326 μL.
- La capacidad de absorción máxima de agua del reservorio es de 90.90%.
- La cohesión microestructural del reservorio aumenta conforme se rehidrata alcanzando un valor máximo 796 Pa. Posteriormente, la cohesión decrece rápidamente debido a su disgregación por rehidratación.
- La energía mínima para la disgregación mecánica del reservorio es de 0.6 m.
- La interacción entre un nivel de rehidratación de 326 μL y una energía de disgregación mecánica de 0.6 m produce una emergencia del 100% de los NEPs del reservorio.
- Los NEPs *S. glaseri* mostraron una infectividad del 95% sobre larvas del último instar de *G. mellonella*.
- Las disgregaciones por rehidratación y mecánica del reservorio no afectan negativamente la infectividad de los NEPs *S. glaseri*.
- Se necesitan investigaciones futuras en campo respecto al efecto de la rehidratación y disgregación mecánica en la patogenicidad de los *S. glaseri* sobre larvas de gallina ciega (*Phyllophaga vetula*).

- Se necesitan investigaciones futuras en campo para conocer los posibles efectos ambientales como cambios de temperatura, radiación UV y humedad del suelo en la liberación e infectividad de los NEPs *S. glaseri* liberados del reservorio.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional, así como al Tecnológico Nacional de México por las facilidades otorgadas para la realización de la presente investigación.

## BIBLIOGRAFÍA

[1] Huang, Y., Luo, X., & Li, Z. (2022). Substitution or complementarity: why do rice farmers use a mix of biopesticides and chemical pesticides in China?. *Pest Management Science*, 78(4), 1630-1639.

[2] Kumar, S., Prasad, S., Yadav, K. K., Shrivastava, M., Gupta, N., Nagar, S., ... & Malav, L. C. (2019). Hazardous heavy metals contamination of vegetables and food chain: Role of sustainable remediation approaches-A review. *Environmental research*, 179, 108792.

[3] Mukhles, M. B., Rahman, M. M., Rana, M. R., Huda, N., Ferdous, J., Rahman, F., ... & Biswas, S. K. (2022). Effect of pesticides on nitrification activity and its interaction with chemical fertilizer and manure in long-term paddy soils. *Chemosphere*, 304, 135379.

[4] Lian, M., Wang, J., Sun, L., Xu, Z., Tang, J., Yan, J., & Zeng, X. (2019). Profiles and potential health risks of heavy metals in soil and crops from the watershed of Xi River in Northeast China. *Ecotoxicology and environmental safety*, 169, 442-448.

[5] Xu, L., Abd El-Aty, A. M., Eun, J. B., Shim, J. H., Zhao, J., Lei, X., ... & Hammock, B. D. (2022). Recent advances in rapid detection techniques for pesticide residue: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(41), 13093-13117.

[6] Cortés-Martínez, C. I., & Chavarría-Hernández, N. (2020). Production of entomopathogenic nematodes in submerged monoxenic culture: a review. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(12), 3968-3985.

[7] Shapiro-Ilan, D., Hazir, S., & Glazer, I. (2019). Advances in use of entomopathogenic nematodes in integrated pest management. In *Integrated management of insect pests* (pp. 649-678). Burleigh Dodds Science Publishing.

[8] Cruz-Martínez, H., Ruiz-Vega, J., Matadamas-Ortíz, P. T., Cortés-Martínez, C. I., & Rosas-Díaz, J. (2017). Formulation of entomopathogenic nematodes for crop pest control—a review. *Plant Protection Science*, 53(1), 15-24.

[9] Silver, S. C., Dunlop, D. B., and Grove, D. I. (1995). Granular formulations of biological entities with improved storage stability, World Patent No 95/0577.

[10] Matadamas-Ortiz, P. T., Ruiz-Vega, J., Vazquez-Feijoo, J. A., Cruz-Martínez, H., & Cortés-Martínez, C.

I. (2014). Mechanical production of pellets for the application of entomopathogenic nematodes: factors that determine survival time of *Steinernema glaseri*. *Biocontrol Science and Technology*, 24(2), 145-157.

[11] Shapiro-Ilan, D., & Dolinski, C. (2015). Entomopathogenic nematode application technology. *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests: Ecology and Applied Technologies for Sustainable Plant and Crop Protection*, 231-254.

[12] Cortés-Martínez, C. I., Lewis, E. E., Ruiz-Vega, J., & Martínez-Gutiérrez, G. A. (2017). Mechanical production of pellets for the application of entomopathogenic nematodes: effect of pre-acclimation of *Steinernema glaseri* on its survival time and infectivity against *Phyllophaga vetula*. *Biocontrol Science and Technology*, 27(8), 940-951.

[13] Kaya, H. K. & S. P. Stock. (1997). Techniques in insect nematology. In L. A. Lacey (Ed), *Manual of Techniques in Insect Pathology*. (pp. 281-324). London: Academic Press.

[14] Girón, P. S. (2008). Evaluación de dos formulaciones de nematodos entomopatógenos para el control de gallina ciega (*Phyllophaga vetula*) en maíz. Tesis de Maestría. IPN CIIDIR-Oaxaca. México.

[15] Liang, R., Liu, M., and Wu L. (2007). Controlled releases NPK compound fertilizer with the function of water retention. *Reactive & Functional Polymers*, 67, 769-779.

[16] Jinsheng Fu., Reynolds G. K., Adams, J. M., Hounslow, J. M., and Salmn, D. A., (2005). An experimental study of the impact breakage of wet granules, *Chemical Engineering Science*, 60, 4005-4018.

[17] Chen, S. & Glazer, I. (2005). A novel method for long-term storage of the Entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* at room temperature. *Biological Control*.32, 104–110.

[18] Martin, R. T. (1962). Adsorbed water on clay: A review. *Clays and clay minerals*, 28-70.

[19] Picasso, G., & Sun Kou, M. D. R. (2008). Aplicaciones tecnológicas de las arcillas modificadas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 74(1), 57-74.

[20] García-Páez, F., & Cruz-Medina, I. R. (2009). Variabilidad de la precipitación pluvial en la región Pacífico norte de México. *Agrociencia*, 43(1), 1-9.

[21] Olguín-López, J. L., Guevara-Gutiérrez, R. D., Mancilla-Villa, Ó. R., Palomera-García, C., & Cruz-Sandoval, G. (2022). Consistencia, homogeneidad y distribución de la precipitación pluvial y temperatura, Región Sierra de Amula, Jalisco, México. *Revista Geográfica de América Central*, (68), 353-378.

[22] Muñoz, H., Orozco, S., Vera, A., Suárez, J., García, E., Neria, M., & Jiménez, J. (2015). Relación entre oxígeno disuelto, precipitación pluvial y temperatura: río Zahuapan, Tlaxcala, México. *Tecnología y ciencias del agua*, 6(5), 59-74.

[23] Clare, E. K., (2004). The influence of the clay fraction on the engineering properties of soil, with some suggestion for future research. Road Research Laboratory, Harmondsworth, Middlesex.

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

[25] Grewal P.S. (2002): Formulation and application technology. In: Gaugler R. (ed.): Entomopathogenic Nematology. Oxfordshire, CABI: 265–287.

## ROLES DE CONTRIBUCIÓN

Rol	Autor (es)
Conceptualización	Víctor Alberto Franco-Luján
Metodología	Adrián Martínez-Vargas
Curación de datos	Heriberto Cruz-Martínez
Administración del Proyecto	Samuel Ramírez-Arellanes
Recursos	Jaime Ruiz-Vega



Esta obra está bajo una licencia internacional Creative Commons Atribución 4.0.