



# INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE ÁLAMO TEMAPACHE

---

## TITULACIÓN

### TESIS PROFESIONAL

EFFECTO DE UN BIOINSECTICIDA A BASE DE LA BACTERIA  
*SACCHAROPOLYSPORA SPINOSA* SOBRE LA MOSCA DE LA  
FRUTA *ANASTREPHA LUDENS*.

### PARA OBTENER EL TITULO DE

Ingeniero(a) en Industrias Alimentarias

### PRESENTA

MELISSA GARCÉS TOLENTINO

### DIRECTOR DE TESIS

M.B ALEJANDRO CRUZ HERNÁNDEZ

### CO-DIRECTOR

M.C PASCUAL HERNÁNDEZ BAUTISTA

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar esta tesis a Dios principalmente por permitirme llegar hasta aquí, darme fuerzas y sobre todo salud, para cumplir con cada una de mis metas.

### **A mi mamá:**

Por cada uno de sus esfuerzos, y su apoyo para cumplir mis objetivos, siempre me ha forjado con buenos hábitos y valores lo cual me ha ayudado a seguir adelante en los momentos difíciles.

### **A mis hermanas:**

Que siempre me apoyaron de manera moral, con su mayor esfuerzo y consejos me motivaron para seguir adelante.

### **M.B Alejandro Cruz Hernández:**

Mas que un maestro, un amigo que me ha apoyado en mi formación académica, siempre motivándome para crecer profesionalmente, quien me ofreció sabios consejos para lograr mis metas.

### **A mi jefe de carrera:**

M.C Humberto Lezama Olivares, ya que, me motivo a iniciar mi carrera y al M.C Pascual Bautista Hernández, quien me motivo para seguir en mi camino académico y me apoyó en momentos clave de mi carrera.

## Dedicatoria

*» Hoy no solo quiero agradecerte por darme la vida, sino también por estar junto a mí en cada paso, sé que guiarme y ayudarme a convertirme en la persona que soy ahora fue un arduo trabajo, pero hoy puedes apreciar los frutos. Espero de ahora en adelante poder retribuir no solo tu amor sino todo lo que has dado por mí, ser un respaldo para ti y hacerte sentir orgullosa a cada paso que dé. Gracias por todo, te amo infinito mamá.»*

*Agradezco al consejo Veracruzano de Investigación Ciencia y Desarrollo Tecnológico (COVEICYDET), por integrarme al rubro de estudiantes becados al proyecto “creación del Centro de Desarrollo Tecnológico de Productos Postcosecha y Subproductos de Veracruz” con clave CJAR 052/2022.*

## RESUMEN

Las espinosinas son compuestos tetracíclicos que actúan sobre los receptores postsinápticos de la acetilcolina nicotínica y los receptores GABA (ácido gamma-aminobutírico); sintetizadas por la fermentación de la bacteria *Saccharypolyspora spinosa*, los compuestos sintetizados por esta bacteria son de interés comercial agroindustrial. Sin embargo, la producción de espinosinas es limitada, en cuanto al rendimiento, y el alto costo de los productos comerciales derivados de la bacteria. Sin embargo, no existen reportes sobre el uso directo del caldo de fermentación sobre plagas, por lo tanto; el presente trabajo de investigación, se determinó la concentración de biomasa  $0.459 \pm 0.1247 \text{ g/L}$  con una  $\mu = 0.060 \text{ h}^{-1}$  y una  $TD = 9.5 \text{ h}$ . A partir de la concentración de biomasa se prepararon formulaciones: 100%, 80%, 50%, 0% con tres repeticiones, y un el control Spinosad<sup>®</sup> comercial para evaluar la actividad toxicológica del caldo de fermentación de la bacteria *S. spinosa* mediante ensayos con moscas de *Anastrepha Ludens*. Los ensayos constaron con 10 ejemplares por triplicado, y a cada ensayo se le adicionó 3 mL en forma de aspersión. Y se demostró que la formulación 1 con 0.459g/L de biomasa eliminó el 90% de los ejemplares de *A. Ludens* con un valor de toxicidad ( $DL_{50}$ ) de 0.310 g/L, además, la bacteria fue reproducida un medio que contenía glucosa y peptona con el objetivo de minimizar costos.

Palabras clave: espinosinas, compuestos tetracíclicos, compuestos sintetizados, caldo de fermentación, plagas, biomasa, actividad toxicológica.

## ABSTRACT

Spinosyns are tetracyclic compounds that act on postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors and GABA (gamma-aminobutyric acid) receptors; synthesized by the fermentation of the bacterium *Saccharopolyspora spinosa*, the compounds synthesized by this bacterium are of commercial agro-industrial interest. However, the production of spinosyns is limited, in terms of yield, and the high cost of commercial products derived from the bacterium. However, there are no reports on the direct use of the fermentation broth on pests, therefore; In the present research work, the biomass concentration  $0.459 \pm 0.1247 \text{ g/L}$  was determined with a  $\mu = 0.060 \text{ h}^{-1}$  and a  $\text{TD} = 9.5 \text{ h}$ . From the biomass concentration, formulations were prepared: 100%, 80%, 50%, 0% with three repetitions, and a commercial Spinosad® control to evaluate the toxicological activity of the fermentation broth of the *S. spinosa* bacterium through assays with *Anastrepha Ludens* flies. The trials consisted of 10 specimens in triplicate, and 3 mL was added to each trial as a spray. And it was shown that formulation 1 with 0.459g/L of biomass eliminated 90% of the specimens of *A. Ludens* with a toxicity value (LD50) of 0.308 g/L, in addition, the bacterium was reproduced in a medium containing glucose. and peptone in order to minimize costs.

Keywords: spinosyns, tetracyclic compounds, synthesized compounds, fermentation broth, pests, biomass, toxicological activity.

# INDICE GENERAL

1 INTRODUCCIÓN .....	x
1.1 Antecedentes.....	xi
1.2 Planteamiento del problema .....	xii
1.3 Justificación .....	xiii
1.4 Hipótesis .....	xiv
1.5 Objetivos.....	xiv
1.5.1 General .....	xiv
1.5.2 Específicos.....	xiv
2 MARCO TEORICO .....	xv
2.1 <i>Anastrepha Ludens</i> .....	xvi
2.1.1 Síntomas .....	xvi
2.1.2 Morfología .....	xvii
2.1.2.1 Cabeza.....	xvii
2.1.2.2 Tórax.....	xviii
2.1.2.3 Alas .....	xviii
2.1.2.4 Abdomen .....	xviii
2.1.2.5 Larva .....	xix
2.1.2.6 Pupa.....	xix
2.2 Control biológico.....	xx
2.3 <i>Saccharopolyspora espinosa</i> .....	xxiii
2.3.1 Espinosinas .....	xxiii
2.3.2 Informigrama .....	xxiv
2.3.3. Producción de espinosinas por <i>S. spinosa</i> .....	xxvii
2.3.4 Espinosad un insecticida de origen natural.....	xxvii
2.4 Dosis letal media LC <sub>50</sub> .....	xxviii
2.4.1 Dosis letal media aguda dérmica (DL50 - aguda dérmica). .....	xxviii
2.4.2 Dosis letal media aguda oral (DL50 - aguda oral).....	xxix
3 ESTADO DEL ARTE.....	xxx

4 METODOLOGÍA .....	xxxv
4.1 Material Bilógico .....	xxxv
4.2 Identificación de larvas <i>A. Ludens</i> .....	xxxv
4.3 Construcción de trampas .....	xxxv
4.4 Entubamiento y producción de la mosca <i>A. ludens</i> .....	xxxvi
4.5 Identificación de la mosca .....	xxxvi
4.6 Activación de la cepa .....	xxxvi
4.7 Preparación de medio de cultivo liquido .....	xxxvi
4.8 Tinción de Gram.....	xxxvii
4.9 Determinación de biomasa utilizando la curva de calibración método de peso seco y espectrofotometría.....	xxxvii
4.10 Preparación de los tratamientos.....	xxxviii
4.11 Aplicación del tratamiento.....	xxxviii
4.12 Dosis letal media LC <sub>50</sub> .....	xxxviii
5 ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS. ....	xxxix
5.1 Identificación de la mosca. ....	xxxix
5.2 Cuantificación de espinosinas.....	xl
5.3 Mortandad estándar de la mosca <i>A. Ludens</i> .....	xlii
5.4 Dosis letal media LC <sub>50</sub> .....	xliv
Discusión.....	xlvi
6 CONCLUSIONES.....	xliv
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	l



## INDICE DE FIGURAS

<b>Ilustración 1: Alas, Morfología. Fuente: Ficha técnica, SAGARPA 2017</b> .....	xviii
<b>Ilustración 2: Larva A. Ludens. Fuente: SESAVE, Mosca de la fruta 2017.</b> .....	xix
<b>Ilustración 3: Pupa, Mosca A. Ludens. Fuente: Características taxonómicas para reconocer la mosca de la fruta, SADER 2018.</b> .....	xx
<b>Ilustración 4 Larva de Anastrepha Ludens (primera etapa de la mosca).</b> .....	xxxix
<b>Ilustración 5 Pupa de Anastrepha Ludens (Segunda etapa del ciclo de la mosca).</b> .....	xxxix
<b>Ilustración 6 Identificación de la mosca de la fruta A. Ludens: A) Mosca A. Luden macho, B) Mosca A. Ludens Hembra, C) Alas de la mosca A. Ludens D) Aguijón de la mosca A. Ludens Hembra.</b> .....	xl
<b>Ilustración 7 Grafico de la relación ABS y peso seco (mg/L), Obtención de la ecuación y R<sup>2</sup>.</b> .....	xli
<b>Ilustración 8: Relación de las formulaciones con respecto al % de la mortalidad en la mosca de la fruta A. Ludens.</b> .....	xlii

## INDICE DE TABLAS

Tabla 2 Uso de insectos benéficos para eliminar plagas. ....	xxii
Tabla 3 Productos hechos con SPINOSAD a partir de las espinosinas naturales, insecticidas comerciales que contienen una mezcla de espinosina A (85%) y espinosina D (15%). ....	xxv
Tabla 4 Cuantificación de biomasa/ Espinosinas. ....	xli
Tabla 5 Bitácora en desarrollo de los tratamientos.....	xliii
Tabla 6 cuantificación en la efectividad formulación/moscas muertas mediante el sistema Probit. ...	xliv
Tabla 7 determinación de la dosis letal media, referenciando la cantidad de moscas vivas o muertas por cada formulación, calculando la viabilidad. ....	xliv
Tabla 8 cálculo de la dosis letal media, utilizando la fórmula y con los datos en la gráfica dosis/viabilidad (tabla 4).....	xlv

## CAPITULO I.- INTRODUCCIÓN

México se consolidó como el quinto productor de naranjas en el mundo con una producción promedio de 4.2 millones de toneladas (SAGARPA 2016) con una balanza comercial de más mas de 3 millones de pesos mexicanos y Álamo Temapache es el principal productor a nivel nacional (SIAP, 2018). Sin embargo, existen plagas que afectan a gran escala a los árboles frutales, el follaje y las flores. Las moscas de la fruta es una de las plagas más importantes en México, ya que provoca directamente daños permanentes en la fruta, afectando los estándares de calidad y características organolépticas, dificultando las ventas en los mercados nacionales e internacionales (2.1 millones de toneladas) (SIAP, 2018).

Las plagas y las enfermedades se controlan de manera más efectiva con el uso de múltiples métodos de control que enfrentan a la plaga. Una alternativa es el uso de microorganismo, como el uso de hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium robertsii* y *Metarhizium anisopliae*), por otro lado, se encuentra el uso de bacterias (*Bacillus thuringiensis*, *Paenibacillus lentimorbus*, *Saccharopolyspora spinosa*). El control biológico se basa en la utilización de microorganismos o insectos buenos que matan a los que son plaga (Colonia 2012). El uso de insectos depredadores de plagas se ha convertido en una herramienta indispensable (AgroSciences 2015). Las espinosinas por su parte son consideradas como un insecticida único, que provienen de la fermentación de la bacteria del suelo, *Saccharopolyspora spinosa*. Por lo tanto; para efecto de este estudio, el método de este tratamiento implica la fermentación a diferentes concentraciones de espinosinas fermentadas en *Anastrepha Ludens* estableciendo así una prueba apropiada para la mortalidad de esta plaga. Principalmente obteniendo e identificando larvas y/o moscas de la mosca de la fruta *A. Ludens*, y determinando la dosis letal media sobre esta plaga validando la hipótesis planteada.

## 1.1 Antecedentes

La agricultura es una actividad económica esencial a nivel mundial, y se estima que alrededor del 10% de la superficie terrestre se utiliza para cultivar productos destinados únicamente al consumo humano (FAO, 2019). Uno de los principales retos de la agricultura es proteger los cultivos de los insectos herbívoros, que son plagas que provocan pérdidas de rendimiento de hasta un 40% con graves consecuencias económicas, sociales y ambientales (FAO 2021). Para controlar este problema, los agricultores han utilizado tradicionalmente productos químicos, en este caso llamados pesticidas sintéticos, en los cultivos. Sin embargo, debido a su falta de especificidad, estos compuestos han causado daños a los ecosistemas y causados daños adicionales a las especies de insectos benéficos y otros organismos, incluidos los humanos (M. Vargas 2006).

*S. spinosa* es un aislado recientemente identificado que produce una variedad de macrociclos. es un nuevo actinomiceto que produce varios compuestos de la familia de los macrólidos que son larvicidas contra mosquitos, ácaros y lepidópteros (Strobel y Nakatsukasa, 1993). El descubrimiento y desarrollo de este organismo le ha dado al mundo nuevos productos comerciales para el control de insectos como Tracer\* y Naturalyte\*.

Las espinosinas son una mezcla de dos metabolitos naturales más activos (Spinosyn A y D) producidos por *S. spinosa* (DowElanco; Thompson 1999). En 1988, este actinomiceto fue identificado como una nueva especie de bacteria: *Saccharopolyspora spinosa*. Pertenece al orden *Actinomycetes*, bacterias con propiedades fúngicas. Esta bacteria es responsable de la descomposición de muchas sustancias orgánicas en el suelo. En 1989, los metabolitos más activos en el caldo de fermentación de *S. spinosa* fueron identificados como *Spinosyns A y D*. Finalmente, en 1994, se desarrolló Spinosad, que es una mezcla de *Spinosyns A y D*. *S. spinosa* es un género poco conocido y raro. En latín, *Saccharo* significa "azúcar" y *polyspora* significa "muchas esporas", por lo que *Saccharopolyspora spinosa* es "un grupo de esporas que crecen en el azúcar". El nombre de la especie *spiny 44* en latín significa "piny" y la especie tiene una apariencia espinosa (Dow AgroSciences, 1998; Pérez).

En la comunidad de Álamo Temapache Ver. Hasta el momento no ha encontrados estudios que confirmen el efecto de las espinosinas en la mosca de la fruta *A. Ludens*, por lo que la implementación de este proyecto es el uso de la fermentación en estado natural de la bacteria *S. spinosa* en la mosca de la fruta *A. Ludens*.

## 1.2 Planteamiento del problema

Álamo Temapache se conoce como la Capital de la Naranja, pues una de sus principales actividades económicas es la producción y distribución de naranja. Siendo uno de los productores más importantes en México y el mundo. La principal fuente de ingresos de este municipio depende de la naranja de jugo. Su importancia radica en que son naranjas muy dulces, además de ser muy jugosa, principalmente la Valencia Tardía.

La mayoría de las plantas productoras de concentrado de jugo para exportación se encuentran instaladas en la región, por lo que es dependiente la producción en naranja con la base económica. Por lo tanto, mantener la calidad de los frutos cítricos es una tarea muy importante, lo que significa que están libres de plagas. Las moscas de la fruta son una de las plagas más importantes de los frutales en México, no solo porque dañan directamente la fruta, sino por las medidas cuarentenarias introducidas dificultando su movilización en mercados tanto nacionales como internacionales (SAGARPA 2015). Con el paso del tiempo la demanda de la citricultura moderna ha generado grandes desafíos para desplazar insecticidas de origen químico, y se han utilizado tratamientos costosos en la postcosecha de los frutos para poder mitigar el agente causal (Larvas de mosca). En el municipio de Álamo Temapache la problemática de los citricultores es el exceso de *A. Ludens* que se alimenta de la pulpa de los frutos, y esto ocasiona restricciones a los mercados internacionales. Ante estas situaciones, se ha utilizado el control químico para combatir la mosca provocando daños ambientales y pérdida de calidad el fruto. Por ello, se han buscado alternativas que sean altamente eficientes y tengan un menor impacto en el medio ambiente, como las herramientas del control biológico. En el 2018 se utilizaba el Spinosad® como alternativa contra *A. Ludens*, derivado de la bacteria *S. Spinosa*. Estos productos tienen como agente activo a las espinosinas, principalmente A y D altamente eficientes. Investigaciones indican que este producto tiene una dosis letal media (DL50) de 2.8 mg/L en 24 horas contra insectos Diana; sin embargo, el producto ha dejado de utilizarse en el municipio de Álamo Temapache por su elevado costo (1400 pesos mexicanos por galón aproximadamente), debido al alto rendimiento de espinosinas, lo que hace que incrementen los costos. Por todo lo anterior, el objetivo es evaluar el efecto toxicológico del caldo de fermentación de la bacteria en moscas de *A. Ludens* a nivel laboratorio y posteriormente elaborar un bioinsecticida.

### 1.3 Justificación

La estructura de las espinosinas tiene un impacto significativo en la actividad biológica de las plagas agrícolas. Las espinosinas son neurotoxinas, compuestos macrólidos tetracíclicos que actúan sobre un grupo de receptores de acetilcolina nicotínicos postsinápticos en algunos insectos. Además de estar clasificado como producto de bajo riesgo toxicológico en EE.UU. Según la Agencia de Protección Ambiental (EPA), ya que tiene una toxicidad muy baja para los mamíferos.

Cabe destacar que la aplicación beneficia los cultivos ya que, actúa por ingestión y por contacto. Es más efectivo cuando se ingiere, posee acción translaminar, los insectos afectados dejan de alimentarse en minutos, posteriormente se paralizan y mueren en aproximadamente 24 horas, por otro lado, las bacterias protegen al cultivo durante 7 hasta 14 días, depende de la radiación solar y la precipitación.

La finalidad de este proyecto es evaluar el porcentaje de efectividad de la fermentación de la bacteria *S. Spinosa* sobre la plaga de la mosca de la fruta *A. Ludens*, así mismo producir esta bacteria totalmente en su estado natural y buscar su disminución en el valor agregado con respecto a los productos químicos fabricados con esta bacteria, favoreciendo a los agricultores, aumentando la producción de la naranja y la calidad de la materia prima.

## 1.4 Hipótesis

El caldo de fermentación de la bacteria *S. Spinosa* tendrá un efecto significativo toxicológico en la Mosca *A. Ludens*.

## 1.5 Objetivos

### 1.5.1 General

Determinar la mortalidad de la mosca de la fruta *Anastrepha Ludens* bajo la aplicación de un bioinsecticida a base de la fermentación de la bacteria *S. Espinosa*.

### 1.5.2 Específicos

- ❖ Obtención de larvas y/o moscas e Identificación de la mosca de la fruta *A. Ludens*.
- ❖ Determinar la formulación óptima del caldo fermentativo de *S. Spinosa* contra *A. Ludens*.
- ❖ Determinar la dosis letal media sobre larvas/mosca *A. Ludens*.

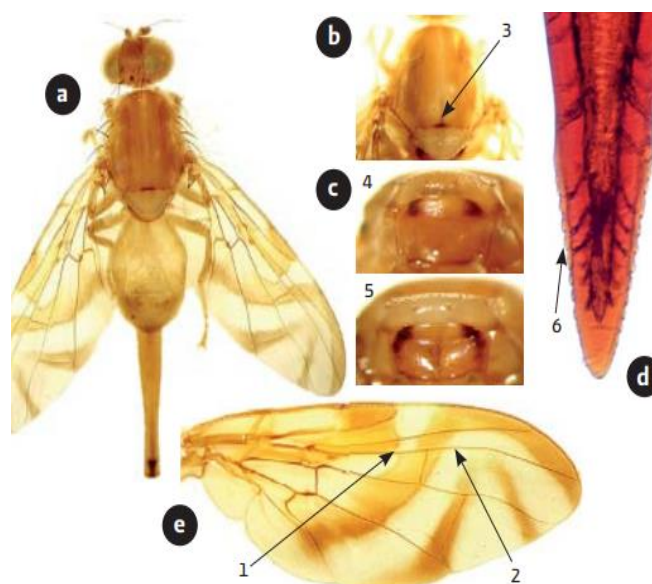
## CAPITULO II.- MARCO TEORICO

La mayoría de los citricultores, manifestaron que carecen de asistencia técnica, algunos opinaron que es necesario Introducir nuevas técnicas agrícolas y un mayor rigor en el combate de plagas y enfermedades; en un periódico los citricultores expresan “hasta el momento sólo se tiene el conocimiento de un especialista en producción frutícola en toda la región”, lo que muestra claramente el desequilibrio en la región. Por su parte, el jefe de Asistencia Técnica de la Comisión Nacional de Fruticultura, Delegación Veracruz Ingeniero J. Sandoval, declaró que esta dependencia sólo ofrece asesoría a los productores que tengan huertas no mayores de 20 hectáreas, que son los que realmente requieren de este servicio.

En cuanto a los reportes de procesos para producir espinosinas a partir de la fermentación en medio líquido de la bacteria *S. Spinosa* (Tamez et al., 2001), solamente se han encontrados publicaciones sobre la optimización del medio como primer para aumentar el rendimiento del producto (Strobel y Nakatsukasa, 1993), (Anderson, 1998; Porcuna, 2019). Sin embargo, no existen reportes en literatura sobre la producción de esta bacteria para la aplicación del control de la mosca de la fruta (*Anastrepha Ludens*). Su objetivo es reducir el número de plagas (insectos, malezas o fitopatógenos) a un nivel económico utilizando diversas estrategias de control (Kumar et al., 1996). El Control Microbiano es una de estas herramientas la cual puede ser empleada de forma semejante a la de un insecticida químico, con la finalidad de obtener una reducción poblacional de la plaga en un determinado momento (Vega, 2008). Sin embargo, los objetivos de este control son más amplios, ya que también puede ser de interés introducir un patógeno dentro de un área, donde estaban ausentes, para lograr su establecimiento y reducir la población del insecto de manera más permanente o prolongada en el tiempo. Además, se pueden tomar medidas para promover epizootias de campo o incrementar la densidad de patógenos existentes en el hábitat, para aumentar la mortalidad producida naturalmente (Gallegos y Aranda, 1996; Casamayor, 1998).

## 2.1 *Anastrepha Ludens*

En México, *A. Ludens* es una importante plaga cuarentenaria en plantas frutales, especialmente en cítricos y mango. Por lo tanto, y de acuerdo a lo anterior, los brotes de moscas de la fruta ocurren frecuentemente en áreas de cítricos como la naranja valencia, *Citrus sinensis* (Vanoye-Eligio et al., 2019). Los daños, como la caída de la fruta, son a consecuencia del crecimiento interno de las larvas (Buentello-Wong et al., 2016). Esta plaga tiene un mayor impacto económico en México, por lo cual el gobierno Federal ha implementado programas para controlar la mosca *A. Ludens* por medio de SAGARPA-SENASICA (Zepeda-Cisneros et al., 2014).



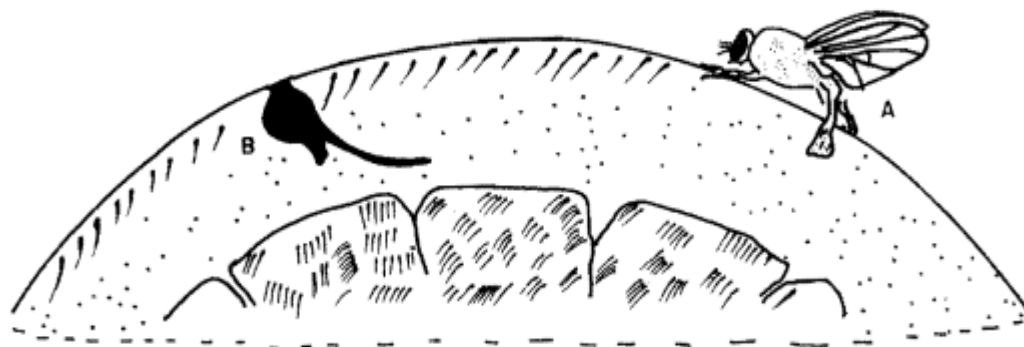
**Figura 1.- Mosca de la fruta *A. Ludens*; Fuente: Guía del reconocimiento de campo del género *Anastrepha*, SAGARPA 2017; a) Hembra adulta, b) Tórax, c) Subesculeto, d) Ovipositor, e) Ala**

### 2.1.1 Síntomas

Se forman pequeñas perforaciones en los frutales infectados, que indican la formación de óvulos, pero estos u otros síntomas de daño son difíciles de detectar en los estados tempranos de la infestación; el daño ocurre dentro de la fruta antes de que se observen síntomas externos como pudrición (Weems et al., 2001). Los ataques de la fruta son realizados por la hembra adulta; perfora la cáscara del fruto para ovipositar; el síntoma de infestación difiere de un fruto a otro; el pomelo infectado generalmente adquiere un color dorado más oscuro antes de alcanzar su maduración;



al emerger del fruto se puede observar a la larva moviéndose lentamente para caer al suelo mientras la fruta infestada permanece en el árbol; en la variedad Marsh de toronja las larvas dañan el centro interno de la fruta y se mueven hacia afuera destruyendo la mayor parte de la pulpa (Baker et al., 1944).



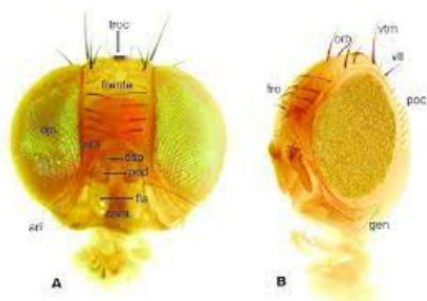
**Figura 2.- A) Hembra de *A. Ludens* abierta con el ovopositor, B) Aglomerado de huevo.** Revista de la Facultad de Agronomía 1979.

### 2.1.2 Morfología

Comprender las características morfológicas de *A. Ludens* es la base para su correcta identificación. El adulto es de mayor tamaño que las moscas domésticas, de color café amarillento, semejante a otras especies del género *Anastrepha* (Weems et al., 2001).

#### 2.1.2.1 Cabeza

Con las genas y el vértice amarillos; cresta facial moderadamente desarrollada y sin cresta media; colas apenas perceptibles en los ojos, con dos pares de alas orbitales al frente; longitud regular de antenas (Hernández-Ortiz, 1992).



**Figura 3.- Cabeza, Morfología de la mosca.** Ficha técnica SAGARPA 2017

#### 2.1.2.2 Tórax

Macrosedas grande de color marrón oscuro o negro; mesonoto y área presutural sin manchas oscuras, pero con franjas sublaterales amarillo claro; puntos negros dispersos que se extienden lateralmente hacia la sutura del escudo; sedas acrosticales presentes; escutelo amarillo claro en su tonalidad; mesopleuras sin un patrón oscuro diferenciado, seda katepisternal débil, presente; seta inferior con una mancha negra a cada lado, a veces extendiéndose hasta la seta media y estrechándose a lo ancho (Hernández-Ortiz,1992).

#### 2.1.2.3 Alas

Las bandas son de color amarillo pálido (Weems et al., 2001); Las bandas en S están intactas, generalmente unidas a las costillas, pero pueden estar ligeramente; siempre hay una mancha hialina en el vértice de R1; Las bandas de S y V siempre están interrumpidas, y el brazo distal de este último está intacto a veces separado del brazo proximal en la parte superior; La curvatura apical de la vena M es moderada (Hernández-Ortiz, 1992).



***Ilustración 1: Alas, Morfología. Fuente: Ficha técnica, SAGARPA 2017***

#### 2.1.2.4 Abdomen

Con todos los terguitos amarillos. Séptimo segmento de la hembra de longitud variable, pero casi el doble de largo que el abdomen; diafragma reversible con grandes y fuertes ganchos dispuestos en triángulo; ovipositor de 3,2 a 5 mm de largo con una punta larga y pequeños dientes redondos, a veces escasos y débiles, que ocupan menos de la mitad de la punta, los machos tienen una cola moderadamente larga y gruesa, pero una punta afilada y una cola corta y gruesa cerca de la mitad, el distifal está presente y bien desarrollado (Hernández-Ortiz, 1992).

#### 2.1.2.5 Larva

Blanca, de 9-11 mm de longitud y 1.5 mm de diámetro, cilíndrico, elongada, curvado ventralmente, con ganchos en las mejillas hacía delante, su parte terminal caudal aplanada, ocho áreas ventrales fusiformes (1 indistinta entre el tórax y el abdomen), once segmentos del cuerpo en adición a la cabeza; los últimos instares miden 9-12 mm de longitud (Weems et al., 2001). El aparato bucofaríngeo con 12 a 16 carinas (Aluja, 1993). Esqueleto céfalo-faríngeo tiene un gancho bucal grande y curvo dos veces más largo que ancho, con hipostoma igual de ancho; el puente trasero este estirado; placa faríngea más largo que la placa dorsal de las alas y con largo soporte faríngeo. Los espiráculos anteriores pequeños, quitinizados, pálidos amarillos, asimétricos, con una depresión media, con 18 túbulos presentes (raramente 12 a 18) (Weems et al., 2001). Estomas posteriores por encima de la línea media horizontal, alargados, dorsalmente 2 inclinados hacia arriba y ventralmente 1 inclinado hacia abajo a cada lado de la línea media; cada estoma tiene tres amplias entradas amarillas; cada estoma posterior tiene un par de pequeñas entradas amarillas por encima y por debajo de cada tubérculo; ano grande en altura, cada lóbulo curvo, hendido, de color marrón oscuro (Greene, 1929).



***Ilustración 2: Larva A. Ludens. Fuente: SESAVE, Mosca de la fruta 2017.***

#### 2.1.2.6 Pupa

Cilíndricos, 5,5-7,5 mm de largo, 2-3,25 mm de diámetro, de color rojo pálido a oscuro, con 11 segmentos, el último prominente. Las estomas anteriores son similares a las larvas, pero de color más oscuro. Estomas posteriores de color marrón rojizo, ubicados debajo de la línea media horizontal; cada válvula tiene tres tomas amarillas anchas concretas distintas. Placa anal grande, ovalada, de color negro rojizo (Greene, 1929).



***Ilustración 3: Pupa, Mosca A. Ludens. Fuente: Características taxonómicas para reconocer la mosca de la fruta, SADER 2018.***

## **2.2 Control biológico.**

Debido al constante aumento de la población, la demanda de producción de alimentos aumenta 70-100% en los próximos años. Pero la seguridad alimentaria humana se ve afectada por muchos factores, entre ellos las plagas, que hoy en día se controlan con altas dosis de plaguicidas sintéticos, provocando graves problemas para la salud humana, resistencia a las plagas, desperdicio de alimentos, contaminación ambiental, brotes de plagas, y reducción en las poblaciones de insectos benéficos. Teniendo en cuenta esta situación mundial, este problema crea una mayor necesidad de métodos de control de plagas eficaces y respetuosos con el medio ambiente.

El control biológico es la acción benéfica de los parásitos, patógenos y depredadores en el control de las plagas y los daños que causan. El control biológico de estos organismos (denominados colectivamente "depredadores") es particularmente importante para reducir las poblaciones de insectos y ácaros. El uso de enemigos naturales en el control biológico de malezas de praderas y áreas silvestres como la maleza *Klamathweed*, *St. Johnswort* también es efectivo. La implementación en la agricultura es importante porque es una tecnología 100% natural que no afecta negativamente al medio ambiente y protege la salud pública; por el contrario, los pesticidas no destruyen completamente las plagas, sino que destruyen los cultivos en los organismos benéficos del suelo e infectan el producto.

Hay cuatro métodos de control biológico disponibles: Inoculación, que consiste en introducir cantidades muy pequeñas de insectos y ácaros (enemigos naturales) benéficos y benéficos en los cultivos para que se multipliquen con el tiempo para el control a corto y la erradicación a largo plazo.

Los métodos clásicos implican la introducción de agentes de control para la erradicación a largo plazo de microorganismos e insectos. Esto libera parásitos y depredadores para combatir insectos y microbios.

Método de inundación, consiste igualmente en la utilización de organismos vivos para controlar plagas. Sin embargo, este método aborda la inserción de un gran número de organismos y crías.

Método de conservación, es más extenso y poco práctico para soluciones rápidas y eficaces. Sin embargo, es un método seguro, que puede ser aplicado previo a la preparación del cultivo. En este sentido, México cuenta con un Centro Nacional de Referencia para el Control Biológico (CNRCB) con el mandato de desarrollar y establecer estrategias de control biológico de plagas reglamentadas. El Centro desarrolla y proporciona alternativas al uso de pesticidas químicos y contribuye a los programas y campañas de sanidad vegetal que promueven el uso de organismos benéficos para mejorar la salud de los cultivos de hortalizas de nuestra nación y promover la productividad y la calidad agrícola. Con el control biológico de plagas se han tratado más de 13.000 hectáreas con microorganismos entomopatógenos, evitando el uso de 272 toneladas de plaguicidas.

**Tabla 1 Uso de insectos benéficos para eliminar plagas.**

Plagas	Enemigos Naturales					Otros grupos y ejemplos
	Crisopa	Mariquitas	Moscas parasíticas	Avispas parasíticas	Ácaros depredadores	
Áfidos	X	X		X		Hongo entomopatogénico, escarabajo, mosca sírfida
Gusano carpintero, larva de la palomilla o polilla de alas transparentes				X		Nemátodos entomopatogénicos
Orugas (gusano del roble de california)	X		X	X		<i>Bacillus thuringiensis</i> , pájaros, hongos entomopatogénicos y virus, insectos depredadores y avispas. <i>Trichogramma</i> spp. (avispa parasítica de huevecillos), arañas
Mosca blanca gigante	X	X		X		<i>Encarsia hispida</i> , <i>Encarsia noyesi</i> , <i>Entedononecremnus krauteri</i> , e <i>Idioporus affinis</i> (avispa parasítica), larva de la mosca sírfida.
Cochinillas harinosas	X	X		X		Catarina destructora del piojo harinoso
Mosquitos						<i>Bacillus thuringiensis</i> spp. <i>Israelensis</i> , pescados que comen mosquitos
Cochinillas	X	X		X	X	<i>Aphytis</i> , <i>Coccophagus</i> , <i>Encarsia</i> y <i>Metaphycu</i> spp. avispa parasítica
Moscas blancas	X	X		X		Chinches ojonas y chinches piratas, avispas parasíticas como <i>Cales</i> , <i>Encarsia</i> y <i>Eretmocerus</i> spp., arañas

### 2.3 *Saccharopolyspora spinosa*

Los microorganismos patógenos se encuentran en la naturaleza y pueden persistir en prácticamente todos los cultivos agrícolas durante largos períodos de tiempo sin dañar el medio ambiente ni matar a los insectos benéficos (Cisneros 2002). "Hasta ahora, no hay evidencia de que los insectos hayan desarrollado resistencia a los insecticidas microbianos". La mayoría de los insecticidas microbianos aún no pueden competir con los insecticidas químicos, especialmente los piretroides sintéticos, en términos de costo y efectividad general (Beegle, 1991).

Identificado como una nueva especie de actinomiceto, llamado *S. Spinosa* (Mertz y Yao, 1990). Además, es un organismo aeróbico, Gram- 4 positivo y compuesto por hifas que contiene cadenas largas de esporas amarillentas y en forma de espinas. La palabra "*Saccharopolyspora*" en latín significa "azúcar con muchas esporas, y la palabra "*spinosa*" se refiere a la apariencia espinosa de las esporas (Thompson et al., 2000). *S. Spinosa* es capaz de producir mediante fermentación natural, más de 20 espinosinas con propiedades insecticidas, pero las más abundantes son la A y la D (Thompson et al., 2000).

#### 2.3.1 Espinosinas

Las espinosinas son productos de fermentación, están constituidas por una estructura de base tetracíclica poliencadenada (aglicón) con un anillo macrólido de 12 miembros y un triciclo 5,6,5-cis-anti-trans, así como por una parte sacárica forosamina y por una parte sacárica 2,3,4-tri-O-metil-L-ramnosa (Kirst et al.,1992).

Las espinosinas son adecuadas contra arácnidos, nematodos e insectos, especialmente lepidópteros y dípteros. Se espera que las plagas de plantas actualmente controladas por espinosinas en el mercado puedan desarrollar resistencia a estos productos activos.

Por lo tanto, es muy importante preparar nuevos derivados de espinosina con actividad biológica para reemplazar las espinosinas utilizadas actualmente para el control de plagas (Pablo Lewer, Donald R. Hahn, Laura L. Carr, Dennis O. Dubellbes, Jeffrey R. Gilbert, Thomas Worden, Thomas C. Sparks 2009). Spinosad® es una mezcla de espinosinas A y D, un pesticida único con alta actividad selectiva contra plagas objetivo y baja toxicidad para organismos no objetivo, incluidos muchos artrópodos beneficiosos.

Estas características hacen del Spinosad una excelente herramienta para el manejo integrado de plagas (Porcuna 2013). A pesar de su gran éxito en el control de plagas, incluso en ensayos de cítricos, el Spinosad es un producto costoso y se necesitan proyectos de investigación para ponerlo a disposición de los cultivadores de cítricos.

### 2.3.2 Infograma de productos comerciales

- Se han aislado alrededor de 23 espinosinas con diferentes grados de actividad biológica.
- Actualmente se trabaja en el desarrollo de moléculas sintéticas llamadas “espinosoides”.
- Actúa por ingestión y por contacto. Es más efectivo cuando se ingiere.
- Poseen acción translaminar.
- La vida media de las espinosinas en la hoja es de aproximadamente dos días.
- provocan excitación del sistema nervioso, postración, y parálisis.
- Activan los receptores nicotínicos de la membrana postsináptica, por medio de un mecanismo desconocido. También afectan a los receptores de GABA. No interfiere con la acción de la acetilcolina, tampoco con la  $\alpha$ -bungarotoxina (inactivada del receptor nicotínico).
- Generalmente protegen al cultivo durante 7 a 14 días. La persistencia depende de la radiación solar y precipitación.
- En condiciones de invernadero, las espinosinas no deben aplicarse más de 10 veces en un año.



**Tabla 2 Productos hechos con SPINOSAD a partir de las espinosinas naturales, insecticidas comerciales que contienen una mezcla de espinosina A (85%) y espinosina D (15%)**

<b>Tipo de insecticidas</b>	<b>Función</b>
<b>SPINOSAD</b>	<p>Las espinosinas son muy activas cuando se ingieren y menos activas después de la exposición.</p> <p>Los productos Spinosad están registrados en más de 30 países para el control de orugas (<i>Lepidoptera</i>), moscas (<i>Diptera</i>), ciertos escarabajos (<i>Coleoptera</i>), termitas, hormigas y otras plagas.</p> <p>Las espinosinas tienen una toxicidad mínima en mamíferos.</p>
<b>CONSERVE SC</b>	<p>Es muy activo con bajo consumo. Es activo contra plagas por ingestión y contacto.</p> <p>Las plagas objetivo muestran síntomas a los pocos minutos del contacto, lo que resulta en un rápido cese del daño a la planta o al césped.</p> <p>El control de insectos Conserve ® SC brinda un control rápido y efectivo de trips, gusanos cortadores, gusanos tejedores de césped, gusanos soldados y otros insectos lepidópteros en céspedes y ambientes ornamentales con bajas tasas de aplicación.</p>

<p><b>NATURALYTE</b></p>	<p>Es un agente insecticida que contiene el ingrediente activo espinosina y un cebo proteico que atrae a los insectos.</p> <p>Se considera un pesticida "no sintético" u orgánico.</p> <p>En California, el Departamento de Alimentos y Agricultura de California (CDFA) utiliza GF-120 NF Naturalyte® para controlar plagas invasoras en áreas urbanas. si se utiliza para este propósito.</p>
<p><b>SPIN TOR</b></p>	<p>Pertenece a la clase de espinosines y fue desarrollado por Corteva Agriscience™ como agente de control de insectos derivado de la fermentación de <i>Saccharopolyspora Spinosa</i> para controlar lepidópteros, trips y minadores.</p>
<p><b>TRACER</b></p>	<p>Innovador insecticida que actúa sobre el sistema nervioso central de las plagas para inducir rápida y eficazmente agitación general, parálisis, colapso y muerte.</p>
<p><b>PALGUS</b></p>	<p><i>Spinosyn J</i> y <i>Spinosyn L</i> han sido modificados químicamente para producir un producto llamado Spinoram, que es más estable en el medio ambiente y mata más rápido que SPINOSAD.</p>

### 2.3.3. Producción de espinosinas por *S. Spinosa*

En los últimos años se han buscado métodos de ingeniería molecular y metabólica para mejorar la producción de espinosinas mediante la fermentación líquida de *S. Spinosa* (Liang et al., 2009; Jha et al., 2014; Zhang et al., 2014; Bai et al., 2015; Galm y Sparks, 2015).

Los métodos de mutagénesis directa no han tenido éxito en la obtención de cepas productoras de Spinosad por encima de 500 µg/ml, por lo que la investigación también se ha centrado en la composición del medio de producción (Zhihua et al., 2006; Liang et al., 2009; Li et al., 2010), teniendo en común el uso de glucosa como principal fuente de carbono. Mertz y Yao (1990) publicaron el aislamiento de *S. Spinosa* de una industria cañera y utilizaron como componentes del medio de cultivo 30 g de caldo de soya tripticaseína, 3 g de extracto de levadura, 2 g de MgSO<sub>4</sub>, 5 g de glucosa y 4 g de maltosa por litro de medio de cultivo.

La cepa se cultivó por 72 h a 30°C. Strobel y Nakatsukasa (1993) utilizaron glucosa 40 g, harina de semilla de algodón 40 g, nutriente a base de leche peptonizada 15 g, licor de maíz 5 g, oleato de metilo 40 g y CaCO<sub>3</sub> 5 g, pH 7 en un litro de agua por 7 a 30 días a 250 rpm en incubadora orbital.

### 2.3.4 Spinosad un insecticida de origen natural.

Las espinosinas son una neurotoxina que consiste en una mezcla de espinosinas A y D (de ahí el nombre spinosAD), que son compuestos macrólidos tetracíclicos que actúan sobre un grupo de receptores nicotínicos de acetilcolina postsinápticos en ciertos insectos (Ruiz 2008). En realidad *s. spinosa* produce varios tipos de espinosinas. Por ejemplo, spinosyn J y spinosyn L han sido modificados químicamente para producir un producto llamado Spinosyn (nombre comercial Palgus®), que es más estable ambientalmente y mata más rápido. El Spinosad es muy activo por ingestión y algo menos por contacto. Los productos basados en el Spinosad han sido registrados en más de 30 países para el control de plagas de orugas (lepidópteros) (Méndez 2002), moscas (dípteros) (Bond 2004), algunos escarabajos (coleópteros), termitas, hormigas y trips (Marina 2014), (Bond 2004), (Pérez et al., 2007).

El Spinosad tiene una toxicidad mínima para los mamíferos y es clasificado como un producto de bajo riesgo toxicológico por la Agencia de Protección al Ambiente (EPA) de los Estados Unidos.

Una revisión de la susceptibilidad de las avispas depredadoras y parasitoides al Spinosad concluyó que este producto es uno de los insecticidas más seguros actualmente disponibles para mantener las poblaciones de depredadores (Williams et al., 2003). Sin embargo, los estudios de laboratorio han señalado efectos adversos sobre poblaciones de avispas parasitoides. Los efectos subletales sobre la longevidad y la reproducción también se han observado con más frecuencia en los parasitoides que en los insectos depredadores (OIEA2023).

Hoy en día, grandes áreas se tratan con Spinosad, por ejemplo, para combatir las moscas de la fruta. De manera similar, las espinosinas en formulaciones granulares y líquidas se usan cada vez más para controlar los mosquitos que transmiten los virus del dengue, *chikungunya* y *Zika* (Dutriz, 2023). De hecho, estudios en México han demostrado que las espinosinas son altamente efectivas para controlar importantes vectores de enfermedades humanas, incluidos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, que se han vuelto resistentes al insecticida organofosforado timetona (Williams 2019).

## **2.4 Dosis letal media LD<sub>50</sub>**

Es una estimación estadística de la cantidad de veneno necesaria para matar el 50% de una población representativa de una especie de prueba seleccionada utilizada en condiciones predeterminadas y controladas en cuanto a raza, edad, sexo, calidad, salud, alimentación y el medio ambiente. Se expresa en miligramos de toxina por kilogramo de peso animal (NOM-Y-302-1988).

### **2.4.1 Dosis letal media aguda dérmica (DL50 - aguda dérmica).**

Se define como la cantidad de veneno capaz de matar a la mitad de una población representativa de animales de laboratorio dentro de las dos semanas de 24 horas de contacto con la piel. Se expresa en miligramos de toxina por kilogramo de peso animal.

Los datos se refieren a conejos a menos que se indique lo contrario. Si no son el animal de prueba más apropiado, la LD50 dérmica aguda es específica para el animal de prueba utilizado (SEGOB 2023).

#### 2.4.2 Dosis letal media aguda oral (DL50 - aguda oral).

Esto se refiere a la cantidad de veneno que puede matar a la mitad de un grupo representativo de animales de laboratorio con una sola administración oral en 14 días. Se expresa en miligramos de toxina por kilogramo de peso animal.

Los datos se refieren a ratas a menos que se indique lo contrario. Si no son el animal de prueba más apropiado, la LD50 oral aguda es específica para el animal de prueba utilizado (SEGOB 2023).

## CAPITULO III.- ESTADO DEL ARTE

Varios autores han reportado el uso de microorganismos como un control de plagas (Moscas de la fruta). Con el fin de mejorar el control biológico y mejorar la producción agrícola.

Microorganismo	Hospedero	Resultado de la actividad	Referencia
<p><i>Hongos entomopatógenos (Beauveria bassiana Bals), para el control de moscas de la fruta.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Las conidios o esporas de hongos generalmente penetran la cutícula de los insectos, pero pueden ingresar al sistema respiratorio través de las estomas o la boca si se ingieren.</li> <li>• Como los hongos entomopatógenos son organismos vivos, el conocimiento de los factores que promueven el desarrollo de las zoonosis es</li> </ul>	<p>Se alimentan de las células del insecto y el crecimiento del micelio libera toxinas que matan al insecto huésped. Además, Los hongos entomopatógenos sintetizan toxinas para el ciclo de relación patógeno-huésped. Entre estas toxinas se han encontrado glicanos, desmetilglicanos y protoglicanos, que son sustancias con actividad tóxica contra insectos, ácaros y nematodos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Antonio Villaseñor, Salvador Flores y Sergio E. Campos (2019).</b></li> <li>• (Barnett &amp; Hunter 1972)</li> <li>• (Ferrón 1981).</li> <li>• (Zimmermann 2007).</li> <li>• Hajek &amp; St. Lefger (1994), Sandhu et al. (2012), Valero-Jiménez et al. (2016).</li> <li>• (Monzón 2001)</li> <li>• (Maniania et al. 2006, Maniania &amp; Ekesi 2013, Flores et al. 2013, Toledo et al. 2017).</li> <li>• (Wright et al. 2001).</li> </ul>

	<p>esencial para utilizar programas de manejo de plagas para predecir y manejar la dinámica de las interacciones plaga-patógeno-ambiente.</p>		
<p><i>Evaluación la interacción de los hongos entomopatógenos Metarhizium robertsii Metarhizium anisopliae, y la avispa parasitoide Diachasmimorpha longicaudata para el control de la mosca A. Ludens.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Los hongos infectan las larvas de la mosca mexicana de la fruta, provocando su muerte.</li> <li>• Las avispas parasitoides cuando se infectan las larvas de la avispa parasitoides.</li> </ul>	<p>Muerte en larvas y Riesgo de depredación del género por parte de las avispas como método ecológico del control de plagas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Presa (2013)</b></li> <li>• (E. Parra, F. Hernández 2023).</li> </ul>
<p><i>Hongos patógenos asociados a “moscas de la fruta” (Diptera: Tephritidae)</i></p>	<p>Larvas y pupas de <i>A. fraterculus</i> y <i>C. capitata</i> que se encontraban en fruta de nogal, durazno y guayaba y en suelo, en</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El método de espolvoreado combate más eficazmente las etapas inmaduras de la plaga y proporciona un 80% de control de plagas.</li> </ul>	<p><b>Dr. Sergio Ovruski Alderete, (2006)</b></p>

<p>la selva de Las Yungas durante los veranos de 2007-2008, 2008-2009 y 2009-2010.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Para lograr un control eficaz de las "moscas de la fruta" lo mejor es utilizar cepas aisladas de ellas.</li> <li>• Se ha observado que el método de aplicación más eficaz es inocular el suelo con el hongo, de forma que las larvas, al sumergirse, se infectan y quedan en el suelo con los muertos y las esporas.</li> </ul>	
<p><i>Bacillus thuringiensis</i>, como control biológico y su efecto insecticida.</p>	<p><i>B. israelensis</i> produce varias toxinas contra mosquitos y moscas (<i>dípteros</i>), las toxinas de <i>B. kurstaki</i> tienen actividad contra mariposas y polillas (<i>lepidópteros</i>) y la <i>B. tenebrionis</i>, produce toxinas que matan escarabajos (<i>coleópteros</i>).</p>	<p><b>Gómez y Pacheco (2022)</b></p> <p>Produce un grupo de proteínas con actividad insecticida durante la transición de la fase vegetativa a la fase de esporas. Estas proteínas son factores de virulencia llamados endotoxinas, y se acumulan en estructuras agregadas altamente ordenadas en estructuras bacterianas similares a "cristales".</p> <p>Las toxinas (exotoxinas) implicadas en la actividad insecticida también se producen y liberan durante la fase vegetativa, incluidos algunos metabolitos, antibióticos, enzimas y otras toxinas proteicas.</p>
<p>Control Biológico de <i>Fusarium solani</i> en tomate mediante el <i>Paenibacillus</i></p>	<p>Control de <i>Fusarium solani</i> mediante el uso de los bioantagonistas</p>	<p><b>Roberto González Tenorio, J. Montealegre, R. Herrera (2004)</b></p> <p>Los resultados indicarían que existe un estímulo del crecimiento de las raíces y de la planta en general, expresándose un mayor peso seco</p>



empleo de los *Bacillus thuringiensis*.

*lentimorbus* 629 y *Trichoderma harzianum* (cepas Thv y Th291)

cuando se aplican cepas de *T. harzianum* y de *P. lentimorbus* 629 para controlar *F. solani*, por lo mismo podría recomendarse la aplicación de estos bioantagonistas dentro de un programa de control integrado de *F. solani* ya sea aplicados por sí solos o en combinación con solarización cuando existe una baja población de *F. solani* en el suelo.

Aplicación de antagonistas microbianos para el control biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. bajo Condiciones de Campo.

- Las cepas de *Trichoderma* pueden activar un mecanismo nativo de defensa en las plantas contra diferentes plagas, conocido como Resistencia Sistémica Inducida
- El control biológico de fitopatógenos con el uso de bacterias antagonistas como *Bacillus* spp, son la

Se aplica a T2. Se concluyó que, de los tres antagonistas evaluados, el hongo H20 (*Trichoderma* spp.) presentó el mayor potencial para el biocontrol de la pudrición de la vaina congelada del cacao en condiciones de campo.

**Jorge Enrique Villamil Carvajal; Silvio Edgar Viteri Rosero, William y Luciano Villegas Orozco (2015)**

(Shoresh *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2013).

(Shoresh *et al.*, 2010).

(Martínez *et al.*, 2013).

(Melnick *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2011; Acebo *et al.*, 2012).

(Acebo *et al.*, 2012).

<p>competencia por nutrientes, minerales y espacio; la síntesis de metabolitos, tales como sideróforos, antibióticos, tóxicos y biosurfactantes, y la inducción de resistencia sistémica en la planta</p>		
---	--	--

## CAPITULO 4.- METODOLOGÍA

### 4.1 Material Bilógico

La cepa fue adquirida en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, con registro de colección nacional de cepas microbianas y cultivos celulares afiliada a la WFCC (World Federation for Culture Collection) de CDBB B-1920. Para reactivar el crecimiento de *S. spinosa*, la cepa se inoculó con un asa de siembra en 50 mL de medio que contenía peptona (10 g/L) y glucosa (50 g/L), ajustado a un pH de 5.8. Previamente el medio se esterilizó en una autoclave, a una presión de 1.0 kg/cm<sup>2</sup> y a una temperatura de 121 °C durante un tiempo de 15 minutos. El medio inoculado se incubó a 120 rpm y 26 °C durante 48 horas y posteriormente se pasó a un medio nuevo que contenía 500 mL de medio de cultivo, incubado con las mismas características antes descritas. Y finalmente se realizó una tinción de Gram, para corroborar la bacteria.

Mientras que las muestras de *A. Ludens* se obtuvieron de naranjas contaminadas recolectadas de una parcela en el Ejido De Pueblo Nuevo, Álamo Temapache Ver.

### 4.2 Identificación de larvas *A. Ludens*

Una vez recolectado la fruta se comenzó con la identificación de la larva de la mosca *A. Ludens*, ya que, al transcurrir un determinado tiempo, el fruto es contaminado por otras plagas e incluso por moscas carroñeras, al identificar la larva correspondiente, se traspasó a naranjas saludables para que las larvas puedan terminar de desarrollarse y tener un monitoreo de su desarrollo.

### 4.3 Construcción de trampas

Paran la trampa donde se desarrollan las larvas, se utilizó un bote transparente, se le colocó tierra a una superficie de 10 cm para el desarrollo de las pupas, se colocan las naranjas contaminadas y se cubrieron con una malla transparente (Tul) para que exista una ventilación y portillo manual para el mejor monitoreo de las moscas.

#### **4.4 Entubamiento y producción de la mosca *A. Ludens*.**

Se construyó la trampa para para incubar las larvas, una vez desarrollada la mosca conforme a su ciclo de vida de aproximadamente 40 a 45 días, las pupas empezaron a desprenderse y se obtuvieron las moscas listas.

#### **4.5 Identificación de la mosca**

La mosca *A. Ludens* necesita 40 a 45 días para desarrollarse, en los cual se divide en tres etapas (se evaluaron sus diferentes etapas para los cuales se dividieron en larvas, pupas y la mosca), cada uno con su tiempo aproximado de desarrollo, se continuó con el análisis de la mosca, determinando así las características según la morfología para su correcta identificación utilizando con ayuda del estereoscopio (Iroscope, MOD ES-24). Al transcurrir 15 a 17 días aproximadamente la mosca se desprende de la pupa, de manera general, la mosca *A. Ludens*, al nacer es de menor tamaño, se presenta de un color amarillo dorado o café, morfológicamente cumple con las características redactadas según SAGARPA (DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL).

#### **4.6 Activación de la cepa**

La cepa fue reactivada mediante la metodología (Liang et al., 2009) y (Martinez-Chavez et al., 2018) en la campana de extracción laminar LUZEREN (BBS-DDC), donde el medio de cultivo contenía glucosa 50 gr/L, peptona 10gr/L y agar 18gr/L. Posteriormente la bacteria *S. Spinosa* fue sembrada en cajas Petri de 5 cm de diámetro, y fueron almacenadas en refrigeración a 4° C. Previamente el medio de cultivo fue esterilizado en una autoclave (MODEL 25X-1), a una presión de 1.0 kg/cm<sup>2</sup> y una temperatura de 121° C por 15 minutos. El medio inoculado se incubó a 25 °C por 48 h en la una incubadora Labnet (211DS).

#### **4.7 Preparación de medio de cultivo líquido**

Se procedió, a realizar medios de cultivo líquidos en la campana de extracción laminar LUZEREN (BBS-DDC), utilizando glucosa 50gr/L, peptona de caseína 10gr/L, y ponerlo en agitación en una parrilla Thermo-Scientific, una vez disuelto, se pasó a esterilizar en la autoclave (MODEL 25X-1), a 121° C durante 15 minutos, al terminar se inocularon las espinosinas tomadas de las cajas Petri, en la campana de extracción laminar LUZEREN (BBS-

DDC), por último, se mantuvo en agitación en una parrilla Thermo-Scientific, durante 48 horas a 140 RPM, para aumentar la biomasa de las bacterias y se guardó en el refrigerador.

#### **4.8 Tinción de Gram**

Con el fin de verificar las bacterias, se realizó la técnica de tinción utilizando etanol haciendo frotis y fijación con un mechero de alcohol en la campana de extracción laminar LUZEREN (BBS-DDC), después agregar cristal violeta por un minuto, enjuagar con agua destilada, se agrega una gota de Lugol por 1 minuto, volver a enjuagar con agua destilada, colocar una gota de alcohol cetona por 30 segundos y volver a enjuagar con agua, por último agregar una gota de Safranina por 1 minuto y enjuagar con agua, para concluir con la técnica se observa en el microscopio Olympus (CX23) para verificar la presencia de la bacteria.

#### **4.9 Determinación de biomasa utilizando la curva de calibración método de peso seco y espectrofotometría.**

La concentración de biomasa se determinó turbidométricamente midiendo la absorbancia de la muestra a 500 nm en un espectrofotómetro UV-Vis UNICO (Modelo 1000). La densidad óptica fue relacionada con el peso seco de biomasa por unidad de volumen a través de la construcción previa de una curva de calibración (ABS/BIOMASA). Se tomaron alícuotas de 10 mL en 8 tubos de ensayo, los cuales se les preparo una dilución con H<sub>2</sub>O de manera exponencial, al terminar se tomó lectura en espectrofotómetro UNICO (Modelo 1000), una vez obtenida la lectura, en 8 cajas de aluminio, previamente secadas en el horno (MODELO STATUS) por 2 horas a 150° C, se tomó el peso en la balanza (AE ADAM) y se vertieron las muestras de los tubos en las cajas de aluminio, para secarlas nuevamente a 105° C durante 24 horas, al terminar se tomó el peso final. Con los datos obtenidos se continuó con la formación de la curva de calibración, utilizando la lectura de la absorbancia y el resultado de la diferencia del peso seco de las cajas vacías y las cajas con biomasa, con lo cual se obtuvo la ecuación de regresión lineal, y una  $R^2$  de 0.9955. absorbancia en función del peso seco, con lo cual se pudo cuantificar a 459.117 6 mg/mL, (Sandoval 2019), posteriormente al obtener el resultado de la

biomasa se realizó una estimación de la cantidad de espinosinas en función de la cantidad de bacterias obtenidas a 212.3882 mg/L de espinosinas (Casados 2021)

#### **4.10 Preparación de los tratamientos**

Antes de la preparación de las soluciones se sometieron un proceso de agitación para separación de las bacterias y un aumento en la biomasa con ayuda de INTELLIGENT ULTRASONIC PROCESSOR y una parrilla Thermo-Scientific , en ella, se tomó una muestra del caldo zonificado, 400 ml en un vaso de precipitado, 30 minutos, para dispersar y homogenizar la muestra, acelerando su proceso de reacción, después se prepararon los tratamientos a 50%, 80% y 100% de la solución diluido en agua destilada, además se utilizó SPINOSAD para lo equivalente a 100 ml de acuerdo a la correlación existente en la etiqueta.

#### **4.11 Aplicación del tratamiento**

Al tener las muestras preparadas, primero se determinó la efectividad de los tratamientos en las larvas de la mosca *A. Ludens*, por lo que se utilizaron 10 larvas por cada prueba colocadas en placas de Petri y se le aplicó un total de 3 mL de los tratamientos, con ayuda de un atomizador para una dispersión más efectiva y uniforme en las larvas, se planteó por triplicado y registro cada resultado al transcurrir 24 horas. Al determinar el tratamiento más efectivo, se realizó la prueba en efecto a 10 moscas determinando así el tiempo y mortalidad después de la aplicación.

#### **4.12 Dosis letal media LD<sub>50</sub>**

Para la LC<sub>50</sub> se utilizó el análisis de regresión lineal con los datos de la mortalidad observados en larvas *A. Ludens*. El análisis fue ajustado aritméticamente, y este arroja como resultado las concentraciones probables, que pueden ser consideradas letales para un porcentaje n de los individuos observados.

## CAPITULO IV.- ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

### 5.1 Identificación de la mosca.

Utilizando las naranjas recolectadas en el norte del estado de Veracruz, Ejido Pueblo Nuevo Álamo Temapache, se aisló la larva que cumplía con las características de acuerdo a la ficha técnica (LEOW, SAGARPA 2015).



*Ilustración 4 Larva de Anastrepha Ludens (primera etapa de la mosca).*

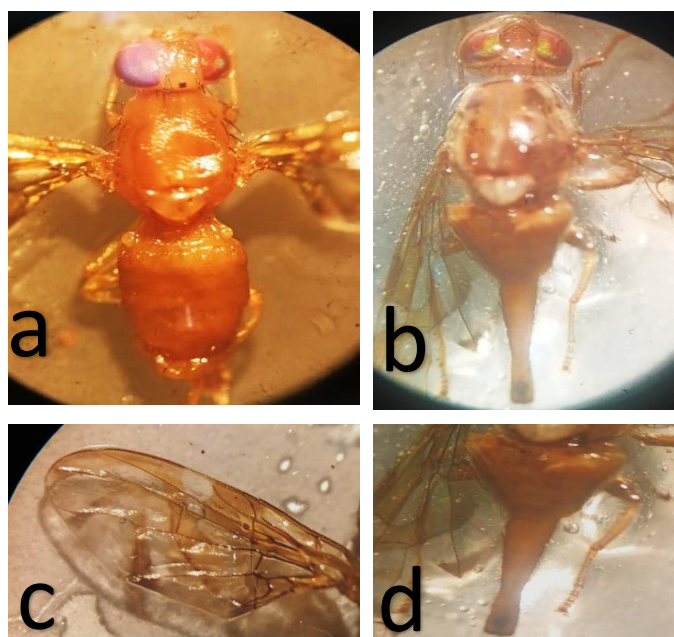
Al separar las larvas de la fruta contaminada, se colocaron en fruta nueva (naranja) para continuar con su desarrollo, al transcurrir 15 a 20 días aproximadamente (dependiendo del tamaño de la larva), comenzaron a observarse pupas en el fondo de la trampa.



*Ilustración 5 Pupa de Anastrepha Ludens (Segunda etapa del ciclo de la mosca).*

Trascurriendo de 15 a 17 días, las pupas emergieron en su etapa final a mosca, por lo que se continuo con identificación de acuerdo de sus características (LEOW, SAGARPA 2015).

Este análisis se realizó con el apoyo de las guías (SAGARPA), para la correcta identificación de las moscas de la fruta, ya que, contienen los elementos básicos para poder reconocer adultos y larvas de algunas de las especies de moscas de la fruta reglamentadas presentes en México, con la finalidad de fortalecer esta competencia a nivel de campo; sin que esto excluya su confirmación a nivel laboratorio por personal especializado en la identificación de esta plaga.



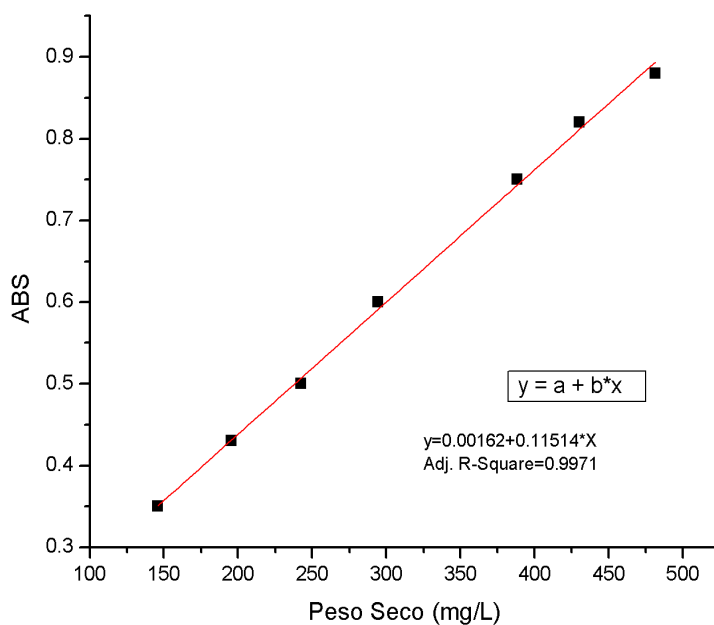
***Ilustración 6 Identificación de la mosca de la fruta A. Ludens: A) Mosca A. Luden macho, B) Mosca A. Ludens Hembra, C) Alas de la mosca A. Ludens D) Aguijón de la mosca A. Ludens Hembra.***

## **5.2 Cuantificación de biomasa.**

Al construir la curva con la regresión lineal de la ABS con respecto al peso seco (mg/L), se determinó la ecuación ( $y=0.00162+0.11514*x$ ) con un coeficiente de correlación de 0.9971. Con este método indirecto se pudo determinar la producción de biomasa en un caldo de fermentación; donde la biomasa  $X=0.459 \pm 0.1247$  g/L en 48 horas, con una  $\mu=0.060h^{-1}$  y una  $TD=9.5h$ .



Otros autores han reportado una producción de biomasa de 0.0325g/L usando una concentración de sustrato de 10g/L y 0.97g/L con 60 g/L en matraz. En los estudios por el grupo de trabajo a nivel de biorreactor de 10 L, se han encontrado concentraciones de 0.775 g/L en lote y 1.320 g/L en lote alimentado, con una  $\mu$  de 0.057 h<sup>-1</sup> y 0.92h<sup>-1</sup> y una TD de 9.90h y 7.70 h. Cabe recalcar, que se trabajó con un medio de cultivo simple, para minimizar gastos de producción de la bacteria.



**Ilustración 7** Gráfico de la relación ABS y peso seco (mg/L), Obtención de la ecuación y  $R^2$ .

**Tabla 3** Predicción de Biomasa/ Espinosinas.

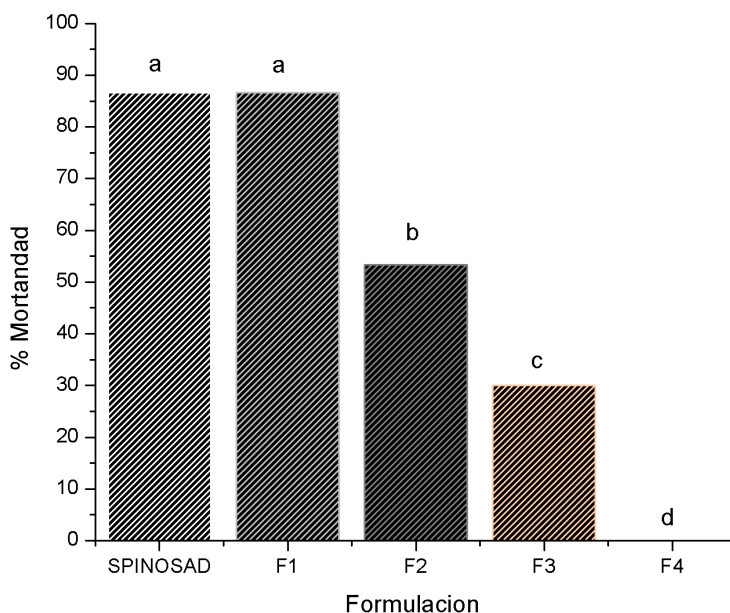
<b>HORAS</b>	<b>48 HRS</b>
<b>REVOLUCIONES</b>	<b>140 RPM</b>
<b>BIOMASA</b>	<b>459.117 6 mg/mL</b>
<b>ESPINOSINAS</b>	<b>212.3882 mg/L</b>

Estos resultados se analizaron con respecto a la metodología empleadas en la producción de espinosinas en sistemas lote, lote alimentado y continuo de la bacteria *Saccharopolyspora spinosa* las cuales, presento un resultado en la determinación de biomasa de 0.775 mg/L en 36

horas en producción por lote, lo cual representa una buena cantidad con respecto al tiempo empleado, así mismo nos fortaleció en el desarrollo de este proyecto.

### 5.3 Mortandad estándar de la mosca *A. Ludens*.

Se realizaron 4 formulaciones, iniciando los tratamientos en larvas de *A. Ludens*, para mejor manipulación se colocaron en cajas Petri sobre una capa de pulpa fresca, el tratamiento consistió en colocar 10 larvas por cada caja, para las bacterias se utilizaron una concentración de 50%, 80% Y 100% DE BIOMASA, en el control se usó SPINOSAD al 1.6 L SAD/2.5L H<sub>2</sub>O de acuerdo a la correlación del empaque.



***Ilustración 8: Relación de las formulaciones con respecto al % de la mortalidad en la mosca de la fruta A. Ludens.***

se realizó una bitácora, para describir el comportamiento de los tratamientos larvas, evaluando así su efectividad.

**Tabla 4 Bitácora en desarrollo de los tratamientos.**

<i>PRIMERA PRUEBA (24 horas)</i>	<i>SEGUNDA PRUEBA (24 horas)</i>	<i>TERCERA PRUEBA (24 horas)</i>
T1: 3 larvas quemadas (pequeñas) y 5 muertas, 2 con poca movilidad.	T1: 3 larvas quemadas (medianas), 4 muertas y 3 vivas con poca movilidad.	T1: 9 larvas muertas y una con poca movilidad.
T2: 4 larvas quemadas (pequeñas), 3 larvas muertas, 1 con poca movilidad y 2 larvas normales (vivas).	T2: 2 larvas quemadas (pequeñas), 6 muertas, 2 con poca movilidad.	T2: 9 larvas muertas y 1 con muy poca movilidad
T3: 5 larvas muertas, 2 larvas con muy poca movilidad, 3 larvas vivas.	T3: 2 larvas quemadas (pequeñas), 2 muertas, 4 con poca movilidad y 2 vivas.	T3: 7 larvas quemadas y 3 vivas con poca movilidad (1 presento tonalidad obscura).
T4: 2 larvas muertas y 8 vivas.	T4: 4 larvas muerta, y 6 con poco movimiento.	T4: 6 larvas que quemadas (medianas), 4 larvas con poca movilidad.

Para continuar se realizó una prueba mediante el método de Tukey, para comparar el funcionamiento del SPINOSAD con el de los diferentes tratamientos, como resultado se comprobó que el control y el F1 son estadísticamente similares al dar una comparación significativa del 80% de la dosis letal media a la mosca *A. Ludens*, lo cual nos garantiza la efectividad del fermentado utilizando una concentración al 100% en un rango de 24 horas.

**Tabla 5 cuantificación en la efectividad formulación/moscas muertas mediante el sistema Probit.**

	MOSCAS VIVAS	MOSCAS MUERTAS	%
<b>CONTROL</b>	2	8	87±0.8164 <sup>a</sup>
<b>F1 (100%)</b>	2	8	90±0.8165 <sup>a</sup>
<b>F2 (80%)</b>	5	5	53±0.2472 <sup>b</sup>
<b>F3 (50%)</b>	6	4	30±0.6329 <sup>b</sup>
<b>F4(0%)</b>	10	0	0

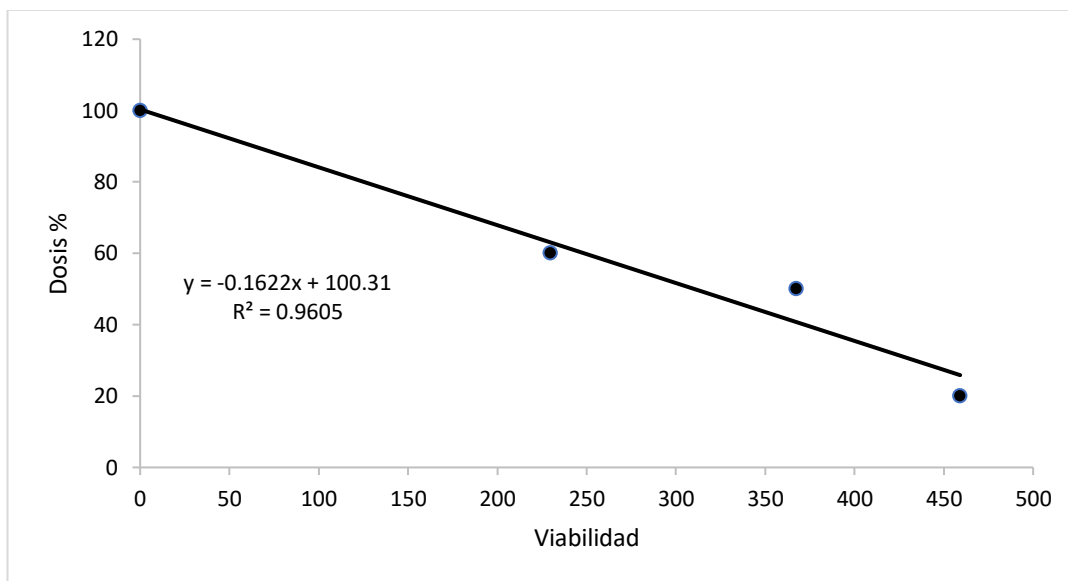
#### 5.4 Dosis letal media DL<sub>50</sub>

*Tabla 6 determinación de la dosis letal media, referenciando la cantidad de moscas vivas o muertas por cada formulación, calculando la viabilidad.*

DOSIS	MOSCAS	MUERTAS			VIABILIDAD			VIABILIDAD %
		2 (HRS)	12 (HRS)	24 (HRS)	2 (HRS)	12 (HRS)	24 (HRS)	
<b>F2 100% (459.1176 mg/L)</b>	10	1	5	8	10	50	90	10
<b>F3 80% (367.294)</b>	10	1	3	5	10	30	53	47
<b>F3 50% (229.5588)</b>	10	0	2	4	0	20	30	70
<b>0</b>	10	0	0	0	0	0	0	100

El porcentaje de viabilidad es del 10% en la formulación 2, con respecto al testigo que fue de 100%, esto quiere decir que, al utilizar una dosis con 459.1176mg/l, en concentración de biomasa es efectiva contra la mosca *A. Ludens*.

Para determinar la mortandad en la mosca *A. Ludens*, primero se obtuvo la ecuación de la recta, para realizar la cuantificación de acuerdo a la fórmula  $X=(Y-B) /M$ , en la cual obtendríamos la estimación de la DL<sub>50</sub>.



**Tabla 7** cálculo de la dosis letal media, utilizando la fórmula y con los datos en la gráfica dosis/ viabilidad (tabla 7).

<b>M</b>	<b>-0.1622</b>
<b>B</b>	100.31
<b>Y</b>	50
<b>X=(Y-B) /M</b>	310.1726

Como resultado, se estima que es necesario una concentración de 310.1726 mg/L, para contrarrestar en un 50% a la mosca de la fruta *A. Ludens*, en un tiempo aproximado de 24 horas.

## **Discusión.**

Para el desarrollo de los ejemplares de *A. Ludens*, el proceso se desarrolló de manera experimental, basándose en la guía sobre la mosca *Anastrepha Ludens* (LOEW) (SAGARPA 2015), similar al proceso natural de acuerdo al tiempo y entorno, coincidiendo en las etapas de la mosca. Para mantener vivas a las moscas, se alimentaron con pulpa fresca de naranja, ya que organolépticamente cumple con lo necesario para nutrir a la mosca, además de mantenerlas en un hábitat natural, diseñando las trampas con ventilación y entrada de luz adecuada, como capa inferior tierra, la cual se mantenía húmeda (se riega cada 24 h), ya que se observó que la mosca se hidrata usando el agua del suelo; Utilizando este medio, la expectativa de vida se prolongó de 60 a 65 días. Otros autores, para prolongar el tiempo de vida de las moscas, usaron un sistema de cría artificial, iniciando con la selección del sistema de ovoposición y segundo la adaptación a la dieta artificial, se utilizó para el desarrollo larvario esferas con polvo de olote, lo que permitió el desarrollo de las larvas hasta su etapa final prolongando la vida entre 60 y 70 días (Flores y Hernández, 2012). Por otro lado, Hernández (2016) utilizó levadura inactiva en polvo para su sistema de alimentación en moscas. Por último, Ros (2006) alimentó a sus moscas con dieta a base de proteína hidrolizada y azúcar, mientras que en las larvas se siembran en bandejas conteniendo el alimento larvario, compuesto por salvado de trigo, azúcar, levadura de cerveza o leche en polvo, y utilizó un fungicida para evitar la aparición de hongos y ácido clorhídrico para acidificar el medio, las pupas son recogidas en contenedores, para estar en reposo a 25° C.

De acuerdo a las comparación con las investigaciones anteriores, se considera que el trabajo de Flores y Hernández (2012) y Ros (2006), representan condiciones adecuadas para la producción y rendimiento a largo plazo sobre la vida de las moscas, aunque presentan un costo elevado en las condiciones en las que se mantienen, con respecto a la metodología empleada en este trabajo, aun así, Flores y Hernández (2012), señala el tiempo de vida (días) de la mosca, después del largo proceso de incubación, coincidiendo con lo estimado en este proyecto, señalando que las condiciones del entorno de estos organismos no interfirieron en la mortandad de las mismas, aun así se sugiere corroborar la eficacia del procedimiento sobre este trabajo para mejores resultados.

Para el crecimiento celular de la bacteria *S. spinosa*, se utilizó un medio de cultivo simple que contenía dextrosa y peptona, obteniendo una biomasa de 459.1176 mg/L. Autores como Casados Molar (2021), realizó el crecimiento celular usando un medio de cultivo que contenía 3 g/L de extracto de levadura, 2 g/L de sulfato de magnesio heptahidratado, 10 g/L de dextrosa, logrando una biomasa de para el sistema de lote con 1.32g/L al transcurrir 30 h y 1.90 g/L a las 28 h para el sistema continuo. En otra investigación Martínez Chávez et.al (2018), en el cual utilizaron extracto de levadura (3 g/L), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (2 g/L) y dextrosa (10 g/L), como medio para el crecimiento de la bacteria, obteniendo como resultado (3.86 g/L) a nivel matraz.

Además, se evaluó el efecto toxicológico del caldo de fermentación, en diferentes concentraciones, siendo la formulación 2 con una biomasa al 100%, logrando una mortandad del 90% de *A. Ludens*, y la dosis letal media con un valor de 310.1726 mg/L. por otro lado, Albornoz Medina (2014), utilizando Hongos entomopatógenos, de acuerdo al trabajo, la DL<sub>50</sub> obtenida en la mosca de la fruta, (sumatoria de larvas, pupas y adultos) ocasionado por *B. bassiana* fue significativamente, la mortalidad de la plaga por acción del hongo varió entre 62 y 66%. Otro autor reporta el uso de bacteria *Bacillus thuringiensis*, aplicación en la mosca *Ceratitis capitata* Vidal (2010), donde en los ensayos cada cepa de *B. thuringiensis* se llevó a cabo siguiendo una metodología que trata de emular las condiciones de exposición en campo, a pesar de la amplitud de la prospección llevada a cabo, no se detectó ninguna cepa con un efecto insecticida sobre adultos de *C. capitata* superior al 30% de mortalidad; una respuesta que resultó baja en relación a otros trabajos realizados con *B. thuringiensis*, (80% de mortalidad en 6 a 10 días) (Alberola1999; Robacker 1996).

Aunque el método empleado en la aplicación de los tratamientos, coincide en el objetivo de erradicar moscas de la fruta, sin embargo en los análisis de resultado son diferentes, ya que, el empleo de la bacteria *Saccharopolyspora spinosa*, refleja un buen resultado en contrarrestar la mosca fruta *A. Ludens*, empleando el tratamiento al 100% de caldo fermentativo, que dio como resultado un 90% de eliminación de mosca y un resultado factible sobre la dosis letal media (310.1726), en un rango de 24 horas, actuando por contacto, por otro lado, de acuerdo al trabajo en hongos entomopatógenos y la bacteria *Bacillus thuringiensis*, se observa un mejor

rendimiento sobre *S. spinosa*, en cuanto el tiempo de reacción sobre el insecto plaga y que compite con el trabajo de los hongos en el tamaño de la población afectada.

En el desarrollo de esta investigación para la determinación de la biomasa en el caldo fermentativo de la bacteria *Saccharopolyspora spinosa*, se utilizó una metodología utilizando una curva de calibración, peso seco y espectrofotometría, técnica que nos permitió formar la curva patrón, mediante diversos cálculos de peso (gr) y volumen (ml) sobre las muestras del caldo fermentativo, estimando con la ecuación de la recta la biomasa. El autor .... Realizo una correlación de la masa con respecto al volumen, obteniendo una  $R^2=0.9866$ , por último, se reconfirmo la técnica, en el trabajo de la Universidad Nacional de Trujillo en la determinación de biomasa con respecto al peso seco (Saldaña 2012), en el cual utilizaron levadura “Fleishman”, utilizando en el cual se presentó una  $R^2=0.840$ , analizando estas técnicas de concluyó la correcta aplicación metodológica, superando los resultados en el coeficiente de determinación con una  $R^2=0.9955$  siendo mejor ya que se acerca a 1.



## 6 CONCLUSIONES

Se identificaron moscas y larvas pertenecientes a *Anastrepha Ludens*, mediante la guía de técnicas morfológicas presentadas por SAGARPA, permitiendo usarlas como modelo experimental para los ensayos de mortandad y  $DL_{50}$ . Además, se utilizó un medio de cultivo básico, que contenía glucosa y peptona lo que reduce los costos de producción, así mismo la bacteria se desarrolló favorablemente produciendo una biomasa máxima de 459.117 6 mg/L.

De acuerdo a las formulaciones establecidas, la F2 dio el 90% en mortandad de *Anastrepha Ludens*, con una  $LD_{50}$  de 310.1726 mg/L, esto quiere decir que el caldo de fermentación favorece al control de la plaga gracias al efecto citotóxico del contenido de espinosinas secretadas en la fermentación. De acuerdo a los resultados, la fermentación es efectiva, por lo que se pudiera desarrollar un bioformulado a escala industrial con el fin de proporcionarlo a los citricultores de la región de Álamo Temapeche.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Pablo Montoya, Jorge Toledo, Emilio Hernández. (2010), Moscas de la fruta: Fundamentos y Procedimiento para su Manejo.
2. Juana Casados Molar, (2021), Producción de espinosinas en sistemas lote, lote alimentado y continuo de la bacteria *Saccharopolyspora spinosa*, maestría en ciencias del ambiente.
3. J. Jesús Loera Gallardo (2017) Dirección General de Sanidad Vegetal, Mosca Mexicana de la Fruta (Loew).
4. A. Villaseñor, S. Flores, S. E. Campos, J. Toledo, P. Montoya, P. Liedo y W. Enkerlin (2019), Uso de Hongos Entomopatógenos para el Control de Moscas de la Fruta en Programas TIE.
5. Ehdibaldo Presa Parra, Francisco Hernández Rosas y Andrea Birke (2023), Complementariedad de agentes de control biológico: el caso de las moscas de la fruta.
6. Tamayo-Mejía, F., Tamez-Guerra, P., Guzmán-Franco, A. W., & Gomez-Flores, R. (2016). Developmental stage affects survival of the ectoparasitoid *Tamarixia triozae* exposed to the fungus *Beauveria bassiana*. *Biological Control*, 93, 30-36.
7. Tamayo-Mejía, F., Tamez-Guerra, P., Guzmán-Franco, A. W., & Gomez-Flores, R. (2015). Can *Beauveria bassiana* Bals. (Vuill)(Ascomycetes: Hypocreales) and *Tamarixia triozae* (Burks)(Hymenoptera: Eulophidae) be used together for improved biological control of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae)?. *Biological Control*, 90, 42-48.
8. Albornoz Medina, Patricia (2014), Hongos patógenos asociados a “moscas de la fruta” (Diptera: Tephritidae) en el sector austral de Las Yungas del noroeste argentino, tesis de doctorado.
9. José Francisco Rodríguez Rodríguez (2020), caracterización genética y enzimática en poblaciones de *plutella xylostella* l. en relación a la resistencia a insecticidas en el estado de Guanajuato, tesis doctor en ciencias en parasitología agrícola.
10. Cisneros, J., Goulson, D., Derwent, L.C., Penagos, D.I., Hernández, O. & Williams, T. (2002) Toxic effects of spinosad on predatory insects. *Biological Control* 23, 156-163.

11. Williams, T., Valle, J. & Viñuela, E. (2003) Is the naturally-derived insecticide Spinosad compatible with insect natural enemies? *Biocontrol Science & Technology* 13, 459-475.
12. Marina, C.F., Bond, J.G., Muñoz, J., Valle, J.F., Quiroz-Martínez, H., Torres-Monzón, J.A. & Williams, T. (2020) Comparison of novaluron, pyriproxyfen, spinosad (granules and tablets) and temephos as larvicides against *Aedes. aegypti* in oviposition traps and domestic water tanks in Chiapas, Mexico. *Salud Pública de México* 62, 424-431
13. Isabel Gómez, Sabino Pacheco (2020), La bacteria *Bacillus thuringiensis* como bioinsecticida en la agricultura actual, UNAM.
14. El economista (2016), Utilización de SPINOSAD para combatir el mosquito, Costa Rica.
15. Rene Porfirio Olayo paredes (1999), Entomopatógenos utilizados en control microbial de insectos plaga, Antonio Narro.
16. Dr. Sergio Ovruski Alderete (2016), Control biológico de "moscas de la fruta" de importancia económica en argentina: Evaluación de parasitoides a través de liberaciones a campo.
17. SH Dreistadt (2022), Control y los enemigos biológicos de los invertebrados, Programa Estatal MIP de la Universidad de California.
18. Flint, ML y SH Dreistadt. 1998. Manual de Enemigos Naturales: La Guía Ilustrada para el Control Biológico de Plagas . Oakland: Universidad. División de California agrícola Nat.
19. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2019), Control biológico de plagas.
20. Lily Xóchilt Zelaya-Molina, Ismael Fernando Chávez-Díaz (2022), Control biológico de plagas en la agricultura mexicana, *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*.
21. Dr. Francisco J. Trujillo, Ing. Francisco Ramírez (2018), Guía e identificación de la mosca de la fruta, SAGARPA.
22. Vicente Hernández Ortiz (2016), Taxonomía e identificación de la mosca de la fruta de importancia económica en América, INECOL.

23. Héctor S. Flores, Emilio Hernández y Jorge Toledo (2012), Desarrollo de un sistema de cría artificial para *Anastrepha Fraterculus* (WIED.) (Diptera: Tephritidae), programa moscafrut SAGARPA-IICA.
24. Emilio Hernández, Pedro Rivera, Marysol Aceituno-Medina, Reynaldo Aguilar-Laparra, Luis Quintero-Fong, Dina Orozco-Dávila (2016), Eficiencia de levaduras para la cría masiva de *Anastrepha ludens*, *A. obliqua* y *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), acta zoológica mexicana.
25. Daniel Sandoval (2019), Obtención de parámetros cinéticos para el crecimiento del microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* en reactor CSTR.
26. Bai, Y., Zhou, P., Fan, P., Zhu, Y., Tong, Y., Wang, H., y Yu, L. (2015). Four-stage dissolved oxygen strategy based on multi-scale analysis for improving spinosad yield by *Saccharopolyspora espinosa* ATCC49460. *Microbial biotechnology*, 8(3):561-568.
27. Buentello-Wong, S., Galan-Wong, L., Arealo-Niño, K., Almaguer-Cantu, V: y RojasVerde, G. (2016). Toxicity of some essential oil formulations against the Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae). *Industrial Crops and Products*, 85: 58-62.
28. Fernandes, B. D., Mota, A., Teixeira, J. A., y Vicente, A. A. (2015). Continuous cultivation of photosynthetic microorganisms: Approaches, applications and future trends. *Biotechnology Advances*, 33(6): 1228–1245.
29. Galm, U., y Sparks, T. C. (2015). Natural product derived insecticides : discovery and development of spinetoram. *Journal of Industrial Microbiology and 29 Biotechnology*, 43: 185-193.
30. Thomas C chispas , Gary D Crouse , James E. Dripps , Pedro Anzeveno , Jacek Martinnow , Carlos V Deamicis , james gifford (2008) QSAR basado en redes neuronales y descubrimiento de insecticidas: spinetoram.
31. Thomas C chispas , Gary D Crouse , Zoltán Benko , David Deméter , Natalie C Giampietro , Guillermo Lambert , Annette V Marrón (2020) Las espinosinas, espinosad, espinetoram y las imitaciones sintéticas de espinosinas: descubrimiento, exploración y evolución de la química de un producto natural y el impacto de las herramientas informáticas.

32. Ke-xue Huang , LiqiuXia , Youming Zhang , Xuezhi Ding , James A. Zahn (2009) Avances recientes en la bioquímica de las espinosinas.
33. Pablo Lewer , Donald R. Hahn , Laura L. Karr , Dennis O Duebelbeis , Jeffrey R Gilbert , Gary D Crouse , Thomas Worden , Thomas C chispas , Pat McKamey Rex Edwards , Pablo R Graupner (2009) Descubrimiento de los insecticidas Butenil-espinosina: nuevos macrólidos de la nueva cepa bacteriana *Saccharopolyspora Pogona*.
34. Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (2016), Establecimiento de áreas libres de plagas para moscas de la fruta (Tephritidae), FAO.
35. Martínez Ruiz Y Francisco E. (2022), *Trichoderma harzianum* y espinosina en el control de gorgojo del trigo *Sitophilus Granarius* (L. 1758), Universidad de Sonora.
36. José Luis Porcuna (2013), SPINOSAD, Ficha Técnica, Servicio de Sanidad Vegetal, Valencia.
37. Bioinsumos (2022), Spinosinas en insecticidas biológicos: igual eficiencia, menos impacto ambiental, AgriBio.
38. Jorge Enrique Villamil Carvajal; Silvio Edgar Viteri Rosero y William Luciano Villegas Orozco (2015), Aplicación de Antagonistas Microbianos para el Control Biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. Bajo Condiciones de Campo.
39. Hilario Celedonio-Hurtado, Pablo Liedo, Martín Aluja, Jorge Guillén, David Berrigan and James Carey (1988), Demografía de *Anastrepha ludens*, *A. obliqua* y *A. serpentina* (Diptera: Tephritidae) en México, vol. 71, Num. 2, pag. 111-120.
40. Roberto Lezama-Gutiérrez, Augusta Trujillo-de la Luz, Jaime Molina Ochoa, Oscar Rebolledo-Domínguez, Alfonso R. Pescador, Marilú López-Edwards, Martín Aluja (2000), Virulencia de *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) sobre *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae): Ensayos de laboratorio y de campo, *Journal of Economic Entomology* , volumen 93, número 4.
41. Venancio Vanoye-Eligio, Roberto Pérez-Castañeda, Griselda Gaona-García, Manuel Lara-Villalón y Ludivina Barrientos Lozano (2015), Fluctuación poblacional de *Anastrepha ludens* en la región de Santa Engracia, Tamaulipas, México.

42. José S. Meza, Francisco Díaz Fleischer, Diana Orozco (2005), El tiempo de pupación como fuente de variabilidad en el rendimiento de apareamiento en *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) criada en masa, *Journal of Economic Entomology*.
43. Martín Aluja, Francisco DíazFleischer, Daniel Papajc, Gloria Lagunes, Juan Sivinski (2001), Efectos de la edad, la dieta, la densidad de hembras y el recurso del huésped sobre la carga de huevos en *Anastrepha ludens* y *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae), *Revista de Fisiología de insectos*.
44. Lyudmila V.Kuzina ,John J. Peloquín ,Don C. Vacek & Tomás A. Miller (2001), Aislamiento e Identificación de Bacterias Asociadas con Adultos de Laboratorio de Moscas Mexicanas de la Fruta, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae).
45. Guillermo K. Heve, Fahiem E El-Borai, Daniel Carrillo, Larry Duncan (2016), Potencial de control biológico de nematodos entomopatógenos para el manejo de la mosca de la fruta del Caribe, *Anastrepha suspensa* Loew (Tephritidae), *Pest Management science*.
46. Kenneth D. Racke, (2006), Un insecticida de riesgo reducido para la agricultura orgánica: estudio de caso de Spinosad, *Productos fitosanitarios para agricultura ecológica*, capítulo 7, pag: 92-108.
47. Mario Soberón, Alejandra Bravo, Bruce E. Tabashnik, Kongming Wu (2016), La resistencia a *Bacillus thuringiensis* mediada por una mutación del transportador ABC aumenta la susceptibilidad a las toxinas de otras bacterias en un insecto invasor.
48. Bonos JG, CF Marina, t Williams (2004), El insecticida de origen natural spinosad es altamente tóxico para las larvas de mosquitos *Aedes* y *Anopheles*, *Medical and veterinary entomology*.
49. Lizbeth González-Cobos, Nicolás Jimarez-Jimarez, Emilio Acosta-Velasco, Andrea Birke-Biewendt (2016), Efecto del Insecticida-cebo GF120™ sobre el Comportamiento de Forrajeo y Oviposición de *Anastrepha ludens* y *Anastrepha obliqua*.
50. P. Montoya, J. Toledo y E. Hernández (2020), Control químico y uso de estaciones cebo.

51. José Cristian Vidal Quist (2010), Estrategias para la utilización de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (Berliner) en el control de *Ceratitis capitata* (Wiedemann).
52. Ing. S. Gonzales, 2012, Determinación de Biomasa, Laboratorio de Biología de los Productos Agroindustriales.
53. J. P. Ros 2016, La Mosca Mediterránea de la Fruta *Ceratitis Capitata* Wied, Biología y Métodos de Control.
54. Melissa B. Blanco, JENNY L. Montañez, 2014, Determinación de la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) de tres insecticidas de uso doméstico con el mismo principio activo.
55. Bonos JG, CF Marina, T. Williams, 2004, El insecticida de origen natural Spinosad es altamente tóxico para las larvas de mosquitos *Aedes* y *Anopheles*.