

Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**EVALUACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC EN LA FORMULACIÓN DE
NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS *Steinernema***

TESIS QUE PRESENTA:

Levi Bravo Soriano

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS

DIRECTOR:

Dra. Gisela Margarita Santiago Martínez

CODIRECTOR:

Dr. Carlos Inocencio Cortés Martínez



Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**EVALUACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC EN LA
FORMULACIÓN DE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS *Steinernema***

TESIS QUE PRESENTA:

Levi Bravo Soriano

Como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCTIVIDAD EN
AGROECOSISTEMAS**

DIRECTOR:

Dra. Gisela Margarita Santiago Martínez

CODIRECTOR:

Dr. Carlos Inocencio Cortés Martínez

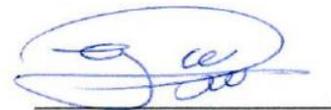


La presente tesis titulada: **EVALUACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC EN LA FORMULACIÓN DE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS *Steinernema***, fue realizada bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS

DIRECTORA:

Dra. Gisela Margarita Santiago Martínez



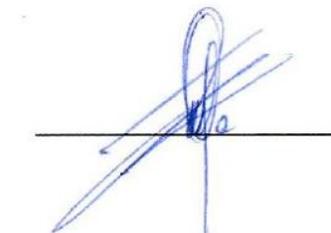
CODIRECTOR

Dr. Carlos Inocencio Cortés Martínez



ASESOR:

Dr. Ernesto Castañeda Hidalgo



ASESOR:

Ph. D. Salvador Lozano Trejo



Ex-Hacienda de Nazareno, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca.
Agosto de 2024.

	Nombre de la Información Documentada: Formato Autorización del comité para entrega de tesis.	Código: ITVO-AC-PR-08-02
	Referencia a la Norma ISO 9001:2015 8.2.1, 8.2.2, 8.2.3, 8.5.2	Revisión: 1
		Página 1 de 1

EXPEDIENTE: **20DIT0009C**

No. DE OFICIO: **DEPI/0705/2024**

Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca: **21/Junio/2024**

ASUNTO: **Autorización del comité para entrega de Tesis.**

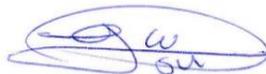
C. LEVI BRAVO SORIANO
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS
P R E S E N T E

Los que suscriben, miembros de su Comité Tutorial, le comunicamos que hemos revisado el contenido de su tesis "Evaluación de nanopartículas de óxido de zinc en la formulación de nemátodos entomopatógenos *Steinernema*". Por lo que con base en los lineamientos para la Operación de Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México se le otorga la **AUTORIZACIÓN** para que proceda a la entrega del documento final de la misma en formato digital (PDF); para continuar con su trámite y asignarle la fecha de su examen de grado.

Sin más por el momento nos permitimos reconocer su esfuerzo y felicitarle por el logro de su documento de tesis.

ATENTAMENTE

*Excelencia en Educación Tecnológica®.
Ciencia y Tecnología para el Campo*



GISELA MARGARITA SANTIAGO MARTÍNEZ
DIRECTORA DE TESIS



CARLOS INOCENCIO CORTÉS MARTÍNEZ
CO-DIRECTOR



ERNESTO CASTAÑEDA HIDALGO
ASESOR



SALVADOR LOZANO TREJO
ASESOR



YURI VILLEGAS APARICIO
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

INSTITUTO TECNOLÓGICO DEL VALLE DE OAXACA
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Comité Tutorial.
Expediente.
YVA/mgih

	Nombre de la Información Documentada: Formato Autorización de DEPI para entrega de Tesis.	Código: ITVO-AC-PR-08-03
	Referencia a la Norma ISO 9001:2015 8.2.1, 8.2.2, 8.2.3, 8.5.2	Revisión: 1
		Página 1 de 1

EXPEDIENTE: 20DIT0009C
No. DE OFICIO: DEPI/0718/2024
 Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca: 27/Junio/2024
ASUNTO: Autorización de entrega de Tesis.

C. LEVI BRAVO SORIANO
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS
PRESENTE

Con base en los Lineamientos para la Operación de Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México, respecto a la presentación del examen de grado, me es muy grato comunicarle que esta División de Estudios de Posgrado e Investigación a mi cargo, **AUTORIZA** la entrega del documento final de su tesis en formato digital (PDF) titulada: "Evaluación de nanopartículas de óxido de zinc en la formulación de nemátodos entomopatógenos *Steinernema*".

Cuyo contenido ha sido revisado y aprobado por su Comité Tutorial y cumple en lo general con el formato establecido para este documento, como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Productividad de Agroecosistemas.

Sin más por el momento le felicito cordialmente por el logro de esta meta y le reitero el respaldo institucional de su Alma Mater.


ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
Ciencia y Tecnología para el Campo

DR. YURI VILLEGAS APARICIO
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

C.p. Expediente.
 Alumno interesado.
 YVA/mglh

ITVO-AC-PR-08-03

Toda copia en PAPEL es un "Documento No Controlado" a excepción del original

REV.1

El presente trabajo se llevó a cabo con el apoyo del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), a través del número de becario (1239880) con el tema de investigación: **“EVALUACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC EN LA FORMULACIÓN DE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS *Steinernema*”**.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT	vi
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivo general	3
1.2 Hipótesis general.....	3
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Las nanopartículas	4
2.1.1 Aplicación de las nanopartículas en la agricultura.....	5
2.2 Óxido de zinc.....	7
2.2.1 Propiedades del ZnO	8
2.2.2 El ZnO nanoestructurado	9
2.2.3 Aplicaciones en el control biológico.....	10
2.3 La gelación iónica.....	11
2.3.1 Proceso de encapsulación	11
2.3.2. Materiales utilizados para encapsulamiento.....	12
2.4 El control biológico	14
2.4.1 Agentes entomopatógenos de control biológico.....	15
CAPÍTULO III. EVALUACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC EN LA FORMULACIÓN DE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS <i>Steinernema</i>	20
Resumen	21
Abstract	22
3.1 Introducción.....	23
3.2 Materiales y métodos	24
3.2.1 Descripción del área de estudio	24
3.2.2 Materiales. Nanopartículas de óxido de Zinc	24
3.2.4 Reproducción de nemátodos entomopatógenos.....	25
3.2.5 Materiales para la formulación	25
3.2.6 Métodos experimentales. Exposición de nemátodos a NP-Ozn en suspensión acuosa.....	26
3.2.7 Exposición de nemátodos a radiación ultravioleta con NP-Ozn en suspensión acuosa.....	26
3.2.8 Formulación de nemátodos en pellets de tierra diatomea-gel con NP-Ozn	27

3.2.9 Evaluación de la supervivencia	28
3.2.10 Bioensayo de infectividad.....	29
3.2.11 Diseño experimental.....	30
3.2.12 Análisis estadístico.....	31
3.3 Resultados.....	32
3.3.1 Supervivencia de juveniles infectivos expuestos a NP-Ozn	32
3.3.2 Efectividad de juveniles infectivos expuestos a NP-Ozn.....	33
3.3.3 Supervivencia de JI expuestos a radiación ultravioleta	34
3.3.4 Infectividad de JI expuestos a radiación ultravioleta	35
3.3.5 Efecto de la adición de NP-Ozn en la supervivencia de JI pelletizados	36
3.3.6 Efecto de la adición de NP-Ozn en la infectividad de JI pelletizados	37
3.4 Discusión	39
3.5 Conclusiones	41
3.6 Literatura citada.....	43
CAPÍTULO IV. BIBLIOGRAFÍA GENERAL.....	46

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
3.1	Componentes de la formulación de pellets de TD-gel con 1000 JI de <i>S. glaseri</i> y <i>S. carpocapsae</i> y nanopartículas de óxido de Zinc (NP-OZn).	25
3.2	Porcentaje de infectividad de los nemátodos <i>S. glaseri</i> NJ43 y <i>S. carpocapsae</i> JAP1 formulados en pellets de TD-gel con NP-OZn, sobre larvas de <i>G. mellonella</i> .	34
3.3	Supervivencia e infectividad de NEP expuestos a diferentes NP, formulados y no formulados.	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
3.1	Supervivencia de los nemátodos <i>S. glaseri</i> NJ43 y <i>S. carpocapsae</i> JAP1 en suspensión acuosa expuestos a NP-OZn.	29
3.2	Mortalidad de <i>G. mellonella</i> por el enfrentamiento con JI de <i>S. carpocapsae</i> JAP1 y <i>S. glaseri</i> NJ43.	30
3.3	Supervivencia de <i>S. carpocapsae</i> JAP1 y <i>S. glaseri</i> NJ43 en expuestos a luz UV.	31
3.4	Mortalidad de <i>G. mellonella</i> por el enfrentamiento con JI <i>S. glaseri</i> NJ43 expuestos a radiación UV.	32
3.5	Vista superior de los pellets de TD-gel con NEP elaborados por el método de gelación iónica.	32
3.6	Evolución de la tasa de supervivencia de los nemátodos <i>S. glaseri</i> y <i>S. carpocapsae</i> formulados en pellets de TD-Gel.	33

RESUMEN

El desarrollo de bioinsumos para el control biológico a base de nemátodos entomopatógenos (NEP) está condicionado por la disponibilidad de tecnología de formulación adecuada para el almacenamiento y la aplicación. Además, para mejorar la efectividad de los NEP como agentes de biocontrol, en aplicaciones foliares, es necesario el uso de coadyuvantes que los protejan ante la radiación ultravioleta (UV). Recientemente, se ha observado que bajas concentraciones de nanopartículas de óxido de Zinc (NP-OZn) en suspensiones con nemátodos *Steinernema carpocapsae* han mostrado protección ante la exposición a radiación UV de 380 nm. El trabajo se realizó en condiciones de laboratorio en el Instituto Tecnológico Del Valle de Etlá. El objetivo fue evaluar el efecto de protección UV de las nanopartículas de NP-OZn sobre la supervivencia del nemátodo *Steinernema glaseri* y *Steinernema carpocapsae* y la infectividad sobre larvas de *Galleria mellonella*, para su formulación en pellets. Juveniles infectivos (JI) en suspensión acuosa (SA) se expusieron a las concentraciones de 20, 40, 200, 500 y 1500 ppm durante 35 días. JI en SA con las concentraciones de 200, 500 y 1500 ppm se expusieron a luz UV durante 10 y 20 min. Los JI se formularon en pellets de tierra diatomea-gel con NP-OZn en las concentraciones de 200, 500 y 1500 ppm y, se evaluaron durante 119 días. La máxima supervivencia media de los nemátodos pelletizados fue de 88.2 días para *S. carpocapsae* JAP1 y de 100 días para *S. glaseri* NJ43, con 500 y 200 ppm de NP-OZn, respectivamente, con infectividad media de 51 a 61 %.

Palabras clave: Biocontrol, juveniles infectivos, pellets, protección UV.

ABSTRACT

The development of bioinputs for biological control based on entomopathogenic nematodes (EPN) is conditioned by the availability of appropriate formulation technology for storage and application. Furthermore, to improve the effectiveness of NEP as biocontrol agents in foliar applications, it is necessary to use adjuvants that protect them from ultraviolet (UV) radiation. Recently, it has been observed that low concentrations of Zinc oxide nanoparticles (NP-OZn) in suspensions with *Steinernema carpocapsae* nematodes have shown protection against exposure to 380 nm UV radiation. The work was carried out under laboratory conditions at the Del Valle de Etna Technological Institute. The objective was to evaluate the UV protection effect of NP-OZn nanoparticles on the survival of the nematode *Steinernema glaseri* and *Steinernema carpocapsae* and the infectivity on *Galleria mellonella* larvae, for formulation in pellets. Juvenile infectives (JI) in aqueous suspension (SA) were exposed to the concentrations of 20, 40, 200, 500 and 1500 ppm for 35 days. JI in SA with the concentrations of 200, 500 and 1500 ppm were exposed to UV light for 10 and 20 min. The JI were formulated in diatomaceous earth-gel pellets with NP-OZn at concentrations of 200, 500 and 1500 ppm and were evaluated for 119 days. The maximum average survival of the pelletized nematodes was 88.2 days for *S. carpocapsae* JAP1 and 100 days for *S. glaseri* NJ43, with 500 and 200 ppm of NP-OZn, respectively, with average infectivity of 51 to 61 %.

Index words: Biocontrol, infective juveniles, pellets, UV protection.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los nemátodos entomopatógenos (NEP) son depredadores naturales que contribuyen a suprimir las poblaciones de insectos, no representan un riesgo para la salud humana y animal y son de creciente interés en la producción agrícola orgánica de alimentos como agentes de control biológico de insectos plaga. El desarrollo y la comercialización de un producto bioinsecticida a base de NEP puede ser posible si se atiende la colecta de cepas virulentas nativas, el mejoramiento de sus aptitudes patogénicas, la producción industrial de juveniles infectivos (JI) viables a bajo costo y el mantenimiento de su infectividad (Cortés-Martínez y Chavarría-Hernández, 2020), la extensión de la vida de anaquel mediante la formulación y el desarrollo de métodos y/o tecnologías de aplicación adecuados (Cruz, Ruiz, Matadamas, Cortés, Rosas., 2017).

La radiación ultravioleta es un factor abiótico que influye en el éxito de la aplicación de los NEP como agentes de control biológico. Por ejemplo, limita su uso contra insectos plaga que habitan por encima del suelo y condiciona su

aplicación por la tarde, muy temprano de mañana y por debajo del suelo (Shapiro, Gouge, Piggott, Fife., 2006). La adición de bajas concentraciones de nanopartículas de óxido de Zinc en suspensiones con nemátodos *S. carpocapsae*, demuestra beneficios para su protección ante este factor abiótico (Makirita, Zhang, Mbega, Chacha, Liu., 2020b).

Las nanopartículas de óxido de zinc (NP-ZnO) pueden poseer características físicas y propiedades químicas únicas que les otorgan propiedades antibacterianas y antifúngicas o de protección a la radiación UV, las cuales han abierto la posibilidad de su uso en la agricultura para la promoción del crecimiento de los cultivos, fertilizantes o pesticidas. Sin embargo, la química, el tamaño y el hecho de ser menos biodegradable han causado una gran preocupación por sus consecuencias ecotoxicológicas (Makirita, Yong, Mbega, Chacha, Zhang., 2020a).

Los estudios publicados sobre el efecto en la supervivencia y la patogenicidad de los nemátodos entomopatógenos por el contacto con nanopartículas metálicas (Makirita, Yong, Mbega, Chacha, Zhang., 2020a; Taha, Abo., 2016) reportan no toxicidad si estas se usan en bajas concentraciones. Por lo anterior, en esta investigación se evaluarán concentraciones de NP-ZnO para darle la protección a los NEP para ser utilizados en el control biológico de manera foliar. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de las NP-ZnO sobre la supervivencia y la infectividad de nemátodos *S. glaseri* y *S. carpocapsae* mantenidos en

suspensión acuosa y formulados en pellets de TD-Gel, en condiciones de laboratorio.

1.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de nanopartículas metálicas en la supervivencia e infectividad de nemátodos entomopatógenos *Steinernema* formulados en pellets.

1.2 Hipótesis general

La adición de nanopartículas metálicas a la formulación de nemátodos entomopatógenos mejora su protección ante la radiación ultravioleta.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Las nanopartículas

Las nanopartículas (NPs) son partículas con dimensiones entre 1 y 100 nm (nanómetros), esto equivale a la mil millonésima parte de un metro y presentan diferentes formas y materiales en correspondencia a su aplicación (Numan, 2021). Las NPs representan una nueva tecnología, al ser un nuevo material, pueden ser: metales, cerámicos, semiconductores, polímeros, o una mezcla de estos; cuya dimensión es de sólido volumétrico y presentan una transición entre moléculas y átomos (Makirita et al., 2020a).

Las NPs son de importancia en la agricultura, al mejorar los sistemas de cultivo, por los nutrientes que otorgan a las plantas (Lowry, Avellan, Gilbertson, 2019); mejoran las funciones fisiológicas, lo que hace que las plantas tengan mayor tolerancia a las diferentes condiciones que se presenten como el estrés ambiental (Kausar Hussain, Javed, Zafar, Anwar, Saqib., 2023). Además, les da resistencia cuando se presenten diferentes enfermedades (Kah, Hussain, Javed, Zafar,

Anwar, Hussain, Saqid, 2019). Una de las grandes ventajas que tienen las nanopartículas es su tamaño, que les permite cruzar barreras biológicas, se transporta por el sistema vascular de las plantas después de aplicarlas de manera foliar, en la raíz o semillas (Munir, Rizwan, Kashif, Shahzad, Amin Zahid, Alam, Imram, 2018). Las NPs al ingresar a las plantas provocan cambios fisiológicos y morfológicos dependiendo de sus propiedades. Se puede medir la eficiencia de las NPs por su composición química, física, tamaño, forma, carga superficial, dosis adecuada, y energía superficial (Zhao y Stenzel, 2018).

Además, las nanopartículas tienen interacciones con las superficies celulares y afectan a las células (Nel, Madler, Velegol, Xia, Hoek, Somsundaran, Klaessing, Castranova, Thompson, 2009). Se ha observado que la morfología de las NPs influye en sus interacciones con las membranas celulares, incluida su capacidad para ingresar a las células (Cho, Wnag, Nie, Chen, Shin, 2008). Debido a las características de las nanopartículas, pueden relacionarse con el entorno geométrico. Se ha destacado los beneficios que aportan las nanopartículas cuando se utilizan en forma esférica y hexagonal, mejorando la calidad y el crecimiento de cultivos como el tomate y el trigo (Faizan, Faraz, Yusuf, Khan, Hayat., 2018, Munir, 2018).

2.1.1 Aplicación de las nanopartículas en la agricultura

La innovación y el desarrollo para producir alimentos en las cantidades y calidad necesarias para alimentar a la población mundial en rápido crecimiento sigue siendo el mayor desafío, en la agricultura y en la elaboración de alimentos, la

aplicación de la nanotecnología ha sido probada en los últimos años y es la de más rápido crecimiento (Lira, 2016).

La aplicación de la nanotecnología en campo abre amplias oportunidades en la producción agrícola, con productos como: nanofertilizantes, nanoplaguicidas, nanoherbicidas y nanosensores, entre otros (Lira, Mendez, Santos, Vera, 2018). Se ha reportado que la aplicación de estos productos podría minimizar la pérdida de nutrientes, aumentar la biodisponibilidad, mejorar la actividad biológica, mejorar la germinación de las semillas, ayudar en el manejo del agua y reducir la cantidad de agroquímicos esparcidos, aumentar la producción de alimentos y reducir el impacto ambiental de manera sostenible (Konappa, Krishnamurthy, Arakere, Chowdappa., 2021).

Diversos materiales nanométricos han sido estudiados en la agricultura. (Stadler, Buteler, Weaver., 2010) evaluaron por primera vez la actividad insecticida de la alúmina nanoestructurada contra dos plagas de insectos, *Sitophilus oryzae* L. y *Rhizopertha dominica* F., principales plagas en granos almacenados en el mundo. Estos autores reportaron una mortalidad significativa después de tres días de exposición continua del trigo tratado con alúmina nanoestructurada, considerando el tratamiento como una alternativa económica y confiable para el control de plagas. Rehman, Majeed, Aslam, Rasul, Sagheer, Ali, Raen., (2021) encontraron que las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de un extracto de *Camelina sativa* funcionaron para el control de la carcoma dentada de los granos (*Oryzaephilus surinamensis*. L) y el gorgojo del grano (*Sitophilus*

granarius. L.), dos plagas de importancia económica del trigo almacenado (*Triticum aestivum*. L.) Por otro lado, Arunthirumeni, Veerammal, Subramanian., (2022) reportaron la eficiencia de la aplicación de nanopartículas de selenio microsintetizadas usando *Trichoderma* sp. En el control del gusano oriental de la hoja (*Spodoptera litura*), una plaga cuarentenaria en México.

El cultivo de tabaco (*Nicotiana benthamiana*. D) y el virus del mosaico del nabo (TuMV) se utilizaron para promover el uso de los nanomateriales (NM) en el crecimiento del cultivo y la resistencia a la infección viral. La presencia de los NM a base de metales y carbono ejerció efectos positivos en el crecimiento del tabaco y la confinación efectiva de la infección viral y la replicación del virus (Hao, Yuan, White, Zhang, Adeel, Zhou, Rui, Xing., 2018). El uso de las nanopartículas en la investigación es por su tamaño (<100 nm) y el óxido de zinc ayuda a los nemátodos contra los rayos ultravioleta.

2.2 Óxido de zinc

Rajiv, Rajeshwari, Venckatesh., (2013), mencionan que el óxido de Zinc (ZnO) es conocido como material semiconductor, que en estudios recientes ha llamado la atención de los científicos por sus propiedades físicas, la que abre una gama de aplicaciones por ser un material único; además, su estructura es hexagonal en su fase wurtzita en condiciones normales de temperatura y presión (300 K; 1 atm). El ZnO ha sido utilizado para solucionar problemas ambientales y es utilizado en la fotocatalisis heterogénea, este fotocatalizador tiene varias ventajas. Una de ellas es la capacidad que tiene para oxidar contaminantes

orgánicos y ha sido utilizado como material sensor, también ha sido utilizado para la degradación de contaminantes con la luz solar (Liu y Lal, 2015).

El ZnO posee propiedades piezoeléctricas, las cuales se refieren al efecto descrito por Jacques y Pierre Curie, donde la aplicación de un estrés mecánico a un material genera energía eléctrica (Chandra, Shama, Arora., 2020). Otra característica del ZnO es su fuerte propiedad piroeléctrica, la cual se entiende como la capacidad de ciertos materiales cristalinos para generar una corriente eléctrica externa en respuesta a un cambio de temperatura. (Kolencik, Ernst, Komar, Urik, Sebesta., 2019). El ZnO es un material funcional muy versátil que, gracias a su estructura cristalina tetraédrica como se encuentra en la wurzita, y puede procesarse para obtener diferentes morfologías, las nanoestructuras del ZnO lo hace uno de los materiales ricos en la familia de las nanoestructuras, tanto en sus características estructurales como en propiedades (Wang, Liu, Hu, Huang., 2015).

2.2.1 Propiedades del ZnO

Algunas de las propiedades de las nanopartículas pueden diferir de las de partículas más grandes del mismo material. Las nanopartículas son químicamente similares a otros preparados del mismo material. Su comportamiento biológico, físico y químico, puede diferir en algunos aspectos, principalmente por el tamaño de la partícula, que juega un papel crucial en las propiedades de las nanopartículas.

Algunas otras de las características del ZnO son su abundancia natural, baja resistividad, no toxicidad, buena retención de luz, entre las, propiedades más relevantes de los materiales optoelectrónicos y piezoelectrónicos; así como propiedades únicas que lo hacen un material optoelectrónico, importante por sus efectos de confinamiento cuántico en condiciones favorables de forma experimental.

Iskandar, (2009), reportaron que las nanopartículas tienen propiedades únicas con una gama de índices de refracción, novedosa fotoluminiscencia, resonancia de plasmones y alta transparencia; y poseen el potencial para para ser aplicados como, portadores de fármacos, pigmentos, sensores, catalizadores, bio-imágenes y materiales ópticos.

2.2.2 El ZnO nanoestructurado

Las nanoestructuras de ZnO son combinaciones de materiales inorgánicos y orgánicos, sirven para convertir de manera eficiente la energía solar en electricidad o combustible. Por ello, las nanoestructuras de ZnO han llamado la atención a diferentes áreas como, la agricultura, medicina debido a que su valor es de bajo costo y tiene actividad antimicrobiana, anti-fúngica, inocuidad y es biodegradable. La energía de las nanoestructuras de ZnO es de 3.37 eV, lo que equivale a 365 nm (Khan, 2019), pueden presentar diferente morfología, nanodiscos, nanotubos, nanopartículas, este depende de los precursores, métodos de síntesis y las condiciones en las que se encuentra.

Las nanoestructuras de ZnO se pueden aplicar en la agricultura por sus propiedades de inocuidad, bioseguridad y biodegradabilidad. Su aplicación en la agricultura tiene como objetivo evitar el uso de productos fitosanitarios sin perder los nutrientes que existen en el suelo, y así poder aumentar los rendimientos a través del uso de nanoestructuras del ZnO (García, Gómez, Obrador, Gonzales, Badin, Fernández., 2017).

2.2.3 Aplicaciones en el control biológico

El uso de nanopartículas de óxido de Zinc (NP-ZnO) de manera foliar reduce el uso de fertilizantes químicos, hay mayor disponibilidad de nutrientes y aumenta la eficiencia de las plantas (Nandhini, Udayashankar, Niranjana, Sogaard, Shetty, Prakash., 2019); por los efectos que provoca en las plantas son más rentables que las formas tradicionales del Zinc, porque aumenta el crecimiento y desarrollo de las plantas (Kolěncík, Ernst, Komar, Urík Sebesta, Dobrocka, Cenry, Kanike, Qian, Feng, Orlova, Kratosova., 2019).

El Zinc es un micronutriente para las plantas y se enfoca en la síntesis de proteínas, estabiliza las membranas de amplia propagación y alargamiento celular (Mousavi, Nguyen, Kellenberger., 2014); brinda protección de los factores ambientales (Sturikova, Huska, Adam., 2018); y ayuda en la adaptabilidad ante las condiciones ambientales (Cakmak, 2017). Las NP-ZnO en los últimos experimentos ha demostrado que tiene efectos positivos en los parámetros fisiológicos y nutricionales en los cultivos (Rizwan, Ali, Adrees, Arshad, Zia, Waris., 2018).

Una de las ventajas es que aumenta el contenido de la parte comestible de las plantas (Subbaiah, Tollamadu, Gilidiará., 2016). Las plantas pueden sufrir estrés y toxicidad, lo que estimula sus sistemas antioxidantes (García-Gómez et al., 2017). Sin embargo, los nematodos utilizados como control biológico foliar enfrentan desafíos ambientales como la luz y la humedad. Por esta razón, se elaboran pellets para ayudarles a enfrentar estos factores, utilizando la técnica de gelación iónica.

2.3 La gelación iónica

La gelación iónica es un método de encapsulación, que da como resultado final capsulas con un tamaño menor a 1000 nm, mediante la técnica de extrusión, la gelación se lleva a cabo con materiales de recubrimiento como celulosas, proteínas, gomas, carbohidratos, solución reticulante y materiales inorgánicos, que son iones de calcio (Patil, Chavenke, Wagh., 2012). La técnica de gelación iónica consiste en producir gotas pequeñas de solución cuando se mezclan los materiales de recubrimiento y la solución de interés a encapsular. El alginato de sodio es el material de recubrimiento más utilizado, por sus características, es un polímero de fácil acceso, alta reactividad y baja viscosidad con los iones calcio. A través de boquillas se generan gotas, que cuando caen a baño de iones se forman capsulas de gel (Nagaoka, Shibata, Kimura, Hashimoto, Antiulcer., 2000).

2.3.1 Proceso de encapsulación

La microencapsulación implica atrapar ciertas sustancias bioactivas dentro de una estructura protectora para resguardarlas de condiciones ambientales

adversas (Sánchez, 2020). Esto se logra mediante la formación de microcápsulas, que consisten en una membrana esférica, fuerte y semipermeable que rodea un núcleo sólido o líquido de tamaño variable, que puede ir desde unas micras hasta 1 mm. Sin embargo, el método manual de encapsulación utilizado por Girón (2008) para nematodos utilizando arcilla bentonita presenta varias limitaciones, como la falta de uniformidad en forma y peso, lo que resulta en una dosificación desigual de los nematodos en cada pellet, variabilidad estructural entre unidades individuales y una producción limitada.

Espinosa (2005) creó una máquina especializada para automatizar el proceso de encapsulamiento, también conocido como pelletización a partir de la teoría de flujo de material granular en una estructura tronco-cónica, propuso una nueva técnica para encapsular nematodos en una variedad de materiales granulares. Esta máquina tiene tres funciones principales: dosificar, dar forma y compactar el pellet.

2.3.2. Materiales utilizados para encapsulamiento

Por lo general, las formulaciones y procesos de encapsulamiento de nematodos entomopatógenos (NEP) consisten en tres componentes principales: el ingrediente activo (IA), que es el nematodo en sí mismo, un agente portador que puede ser sólido, líquido, en forma de gel o incluso cadáveres de insectos infectados, y una serie de aditivos. Estos aditivos incluyen absorbentes, adsorbentes, emulsionantes, surfactantes, espesantes, humectantes,

dispersantes, agentes antimicrobianos y protectores contra los rayos UV (Grewal, 2002; Cruz-Martínez et al., 2017).

Entre los materiales empleados para encapsular NEP se incluye el alginato, un biopolímero obtenido de algas como *Lessonia nigrescens* y *L. trabeculata* (Cabané, Alvo, Neira, Cavaiades, Gace., 2011). El alginato se utiliza para formar matrices que encapsulan las células vivas de NEP. Este proceso implica la formación de pequeñas esferas al dejar caer una mezcla de alginato de sodio y células sobre una solución que contiene cationes multivalentes como Ca^{2+} (Mujica, 2006). La eficacia de estas matrices de alginato para encapsular NEP radica en su capacidad para prolongar la vida útil de los nematodos al inmovilizarlos y protegerlos de condiciones ambientales adversas (Rumbos y Athanassiou, 2017; Goud, Hugar, Prabhuraj., 2010).

Además, los NEP pueden aplicarse de diversas maneras, ya sea en formulaciones acuosas, en cadáveres de insectos infectados parcialmente deshidratados y colocados en materiales como arcilla o vermiculita, o bien protegidos en un hidrogel mediante el proceso de encapsulamiento. Este enfoque se emplea para salvaguardar los NEP de las condiciones ambientales desfavorables y aumentar su persistencia al incorporarlos en una matriz polimérica (Cruz, Ruiz, Matadamas, Cortés, Rosas., 2017; Hussein y Abdel, 2012; Madziva, Kailasapathy, Philips., 2005).

El proceso de encapsulación simplifica tareas como el almacenamiento, transporte y aplicación de estos microorganismos, al mismo tiempo que resguarda al nematodo de condiciones ambientales desfavorables, posibilita la aplicación en áreas específicas, reduce el uso de agua y prolonga su vida útil (Kaya y Nelsen, 1985; San Blas, 2013; Hiltbold, 2015). Los pellets son de mucha importancia para los nemátodos, porque se pueden transportar de un lado a otro. Los materiales utilizados para el encapsulamiento le brindan a los nemátodos las condiciones que ellos necesitan para poder llevarlos a campo, y puedan contribuir con el control biológico de plagas.

2.4 El control biológico

En el control biológico (CB), se emplean organismos vivos para reducir las densidades de poblaciones de plagas, disminuyendo así su abundancia o daño (Eilenberg, Hajek, Lomer., 2001). En los últimos años, el CB se ha convertido en el método principal de control de plagas en una variedad creciente de cultivos y ecosistemas (Cook, 1988). La agroecología desempeña un papel crucial al enfatizar el uso de recursos locales para mantener la biodiversidad, con el fin de satisfacer las necesidades de los agricultores y adaptarse a las condiciones naturales para transformar la producción de alimentos (FAO, 2020). Todo apunta a que el éxito en la conservación de la biodiversidad ha estado estrechamente vinculado a la interacción entre la ciencia y la formulación de políticas (Moonen & Bárberi, 2008).

En la actualidad, se menciona el concepto de control biológico por conservación (CBC), el cual se centra en la modificación del entorno y las prácticas agrícolas con el fin de promover, proteger y mejorar la presencia de enemigos naturales u otros organismos para reducir el impacto de las plagas (Eilenberg, Hajek, Lomer., 2001).

El CBC se destaca como una estrategia fundamental para el manejo de plagas que afectan diversos cultivos, especialmente aquellos de frutas y hortalizas que se consumen principalmente frescos. Este enfoque de gestión de plagas ofrece una alternativa para mantener las poblaciones de parasitoides y depredadores autóctonos en los campos (Rodríguez, Avilla, Aparicio, Gabarra, Riudavets, Alegre, Lordan, Alins., 2019). Además, proporciona presas y huéspedes, así como recursos y refugios alternativos durante la temporada invernal.

2.4.1 Agentes entomopatógenos de control biológico

Este apartado ofrece una revisión de las investigaciones realizadas hasta la fecha sobre los organismos entomopatógenos utilizados en el control de plagas en la agricultura, ganadería y silvicultura en México. Se destacan varios tipos de estos organismos, incluyendo:

1. Bacterias: estos microorganismos unicelulares, que generalmente tienen un tamaño de 1 a 7 μm , son abundantes en la naturaleza. A pesar de su tamaño y estructura celular simple, sin núcleo ni organelos definidos (Murray, Rosentahl y Pfaller, 2009), desempeñan un papel fundamental

como fábricas bioquímicas esenciales para la ecología del suelo (Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Darnell., 2006). Las bacterias entomopatógenas tienen la capacidad de invadir al huésped y eludir sus defensas para proliferar y reproducirse, lo que provoca enfermedades, gracias a factores de patogenicidad como toxinas y enzimas. Una vez que causan la muerte del insecto, las nuevas generaciones de bacterias emergen para infectar nuevos huéspedes (Jurat-Fuentes & Jackson, 2012). En cuanto a los bioinsecticidas para diversos tipos de cultivos, aquellos basados en bacterias entomopatógenas representan el 74% del valor de mercado (Thakore, 2006), lo cual es comprensible dado los múltiples roles que las bacterias desempeñan en la relación con los insectos. Sin embargo, solo algunas bacterias patógenas de insectos se han utilizado como agentes de control biológico (Mnif & Ghribi, 2015), siendo *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Berliner) la más común y ampliamente empleada como ingrediente activo en los bioinsecticidas (Jisha, Smitha, & Benjamin, 2013).

2. Hongos. Los hongos entomopatógenos representan un recurso de gran potencial como agentes de control, con más de 750 especies identificadas dispersas en el medio ambiente, capaces de provocar infecciones fúngicas en poblaciones de artrópodos (Pucheta, Flores, Rodríguez, Torres, 2006). Según Samson, Evans, Latgé., (1998), los hongos entomopatógenos fueron los primeros agentes biológicos utilizados para controlar plagas, ya que, según Asaff, Reyes, López y De la Torre (2002), pueden causar

enfermedad y muerte en los insectos. Estos microorganismos infectan directamente a los artrópodos al penetrar su cutícula y emplean diversos mecanismos de acción, lo que les confiere una alta eficacia para evitar que el huésped desarrolle resistencia. Sin embargo, Meyling y Eilenberg (2007), señalan que, para utilizarlos como método de control biológico, se requieren prácticas agrícolas que manipulen el entorno para favorecer las poblaciones de hongos entomopatógenos. Se considera fundamental tener conocimientos sobre aspectos ecológicos del hongo, como la humedad relativa, temperatura, patogenicidad, virulencia y los huéspedes que infecta activamente.

3. Nemátodos. Los nematodos entomopatógenos (NEP) son organismos que naturalmente residen en el suelo y parasitan, especialmente insectos en sus etapas inmaduras, destacándose las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae por su eficacia en el control de plagas (Cano, 2011). El ciclo de vida de estos nematodos comprende etapas que incluyen huevo, cuatro estados juveniles (J1 a J4) y adulto. Los juveniles infectivos (JI) penetran al huésped a través de sus orificios naturales o heridas, y una vez dentro, liberan bacterias simbiotas del género *Xenorhabdus* (en el caso de Steinernematidae) o *Photorhabdus* (Heterorhabditidae). Estas bacterias atacan los tejidos internos del huésped, causando su muerte por septicemia, y posteriormente se evidencia una coloración característica de la infección (amarilla o roja, respectivamente) (Burnell y Stock, 2000; Griffin, 2005; Burgos, 2017). La eficacia de los NEP para eliminar las

plagas de insectos en un período de 24 a 48 h, junto con el desarrollo de formulaciones comerciales (Kaya, 1990; Hiltbold, 2015), los convierte en una opción viable para el control de *C. sordidus* en los cultivos de plátano. Los NEP se encuentran distribuidos globalmente, con especies y grupos distintivos presentes en diferentes regiones geográficas. Hasta la fecha, se han identificado alrededor de 90 especies de nematodos de la familia Steinerneratidae y 20 de la familia Heterorhabditidae en el mundo (Labaude y Griffin, 2018). Los NEP necesitan niveles apropiados de humedad en el suelo para su supervivencia y movilidad, aunque un exceso de humedad puede ocasionar la falta de oxígeno y limitar su desplazamiento (Baimey, Zadji, Afouda, Moens, Decraemer., 2015). Se aconseja el riego para mantener la humedad y facilitar el asentamiento de los nematodos en las capas subterráneas del suelo. La inclusión de adyuvantes puede ayudar a reducir la pérdida de humedad, especialmente cuando se aplican NEP por vía foliar, lo que puede aumentar el estrés debido a la deshidratación (Rezaei, Karimi, Hosseini, Goldani, Campos., 2015).

4. Virus. Los virus se clasifican de acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV) (Fauquet, Mayo, Maniloff, Desselberger, Ball., 2005; Ibarra y Del Rincón, 2010), considerando diversos aspectos como el tipo de ácido nucleico (ADN o ARN), si son de cadena sencilla o doble (dsDNA o dsRNA), su polaridad (+ o -), la morfología y tamaño del virión, la presencia o ausencia de cuerpos de inclusión (COs), la presencia de envoltura, el rango de hospederos, entre otros. Las familias Baculoviridae,

Poxviridae y Reoviridae comparten la característica de formar COs, una estructura que ha evolucionado de forma independiente como un mecanismo de protección contra la degradación ambiental. Estas características, entre otras, les otorgan una ventaja significativa para su uso como bioinsecticidas (Caballero y Williams, 2008). A continuación, se detallan las principales familias de virus entomopatógenos. Los virus se pueden clasificar en dos grupos según su estructura: los virus incluidos, que presentan una matriz amorfa proteica que contiene la nucleocápside, que incluye a los virus de las poliedrosis (nucleares o citoplasmáticos) y los virus de las granulosis (nucleares o citoplasmáticos); y los virus no incluidos, que no son fácilmente detectables y no han sido ampliamente estudiados.

CAPÍTULO III

EVALUACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC EN LA FORMULACIÓN DE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS *STEINERNEMA*

Resumen

El desarrollo de bioinsumos para el control biológico a base de nemátodos entomopatógenos (NEP) está condicionado por la disponibilidad de tecnología de formulación adecuada para el almacenamiento y la aplicación. Además, para mejorar la efectividad de los NEP como agentes de biocontrol, en aplicaciones foliares, es necesario el uso de coadyuvantes que los protejan ante la radiación ultravioleta (UV). Recientemente, se ha observado que bajas concentraciones de nanopartículas de óxido de Zinc (NP-OZn) en suspensiones con nemátodos *Steinernema carpocapsae* han mostrado protección ante la exposición a radiación UV de 380 nm. El trabajo se realizó en condiciones de laboratorio en el Instituto Tecnológico Del Valle de Etla, del 20 de agosto de 2021 al 15 de diciembre de 2023. El objetivo fue evaluar el efecto de protección UV de las nanopartículas de NP-OZn sobre la supervivencia del nemátodo *Steinernema glaseri* y *S. carpocapsae* y la infectividad sobre larvas de *Galleria mellonella*, para su formulación en pellets. Juveniles infectivos (JI) en suspensión acuosa (SA) se expusieron a las concentraciones de 20, 40, 200, 500 y 1500 ppm durante 35 días. JI en SA con las concentraciones de 200, 500 y 1500 ppm se expusieron a luz UV durante 10 y 20 min. Los JI se formularon en pellets de tierra diatomea-gel con NP-OZn en las concentraciones de 200, 500 y 1500 ppm y, se evaluaron durante 119 días. La supervivencia y la infectividad de los JI de *S. glaseri* y *S. carpocapsae* no es afectada por la exposición a las NP-OZn, otorga protección frente a los rayos UV y mejora su desempeño cuando se formula en pellets de tierra diatomea-gel. A excepción de la infectividad de *S. carpocapsae* en los tratamientos de exposición a radiación UV y con NP-OZn.

Palabras clave: *Steinernema*, biocontrol, pellets, protección UV.

Abstract

The development of bioinputs for biological control based on entomopathogenic nematodes (EPN) is conditioned by the availability of appropriate formulation technology for storage and application. Furthermore, to improve the effectiveness of NEP as biocontrol agents in foliar applications, it is necessary to use adjuvants that protect them from ultraviolet (UV) radiation. Recently, it has been observed that low concentrations of Zinc oxide nanoparticles (NP-OZn) in suspensions with *Steinernema carpocapsae* nematodes have shown protection against exposure to 380 nm UV radiation. The work was carried out under laboratory conditions at the Del Valle de Etna Technological Institute, from August 20, 2021 to December 15, 2023. The objective was to evaluate the UV protection effect of NP-OZn nanoparticles on the survival of the nematode *Steinernema glaseri* and *S. carpocapsae* and the infectivity on *Galleria mellonella* larvae, for their formulation in pellets. Infective juveniles (JI) in aqueous suspension (SA) were exposed to concentrations of 20, 40, 200, 500 and 1500 ppm for 35 days. JI in SA with the concentrations of 200, 500 and 1500 ppm were exposed to UV light for 10 and 20 min. The JI were formulated in diatomaceous earth-gel pellets with NP-OZn at concentrations of 200, 500 and 1500 ppm and were evaluated for 119 days. The survival and infectivity of the JI of *S. glaseri* and *S. carpocapsae* is not affected by exposure to NP-OZn, it provides protection against UV rays and improves its performance when formulated in diatomaceous earth-gel pellets. With the exception of the infectivity of *S. carpocapsae* in the treatments of exposure to UV radiation and with NP-OZn.

Keywords: Bioinsecticides, formulation, infective juveniles.

3.1 Introducción

Los nematodos entomopatógenos (NEP) son depredadores naturales que contribuyen a suprimir las poblaciones de insectos, no representan riesgo para la salud humana y animal y son de creciente interés en la producción agrícola orgánica de alimentos como agentes de control biológico de insectos plaga. El desarrollo y la comercialización de un producto bioplaguicida a base de NEP es posible si se atiende la colecta de cepas virulentas, el mejoramiento de sus aptitudes patogénicas, la producción industrial de juveniles infectivos (JI) viables a bajo costo y el mantenimiento de su infectividad (Cortés-Martínez y Chavarría-Hernández, 2020), la extensión de la vida de anaquel mediante la formulación y el desarrollo de métodos y/o tecnologías de aplicación adecuados (Cruz-Martínez y col. 2017).

Las nanopartículas de óxido de zinc (NPs-ZnO) por sus propiedades opto-eléctricas, físicas y antimicrobianas presentan efectos positivos en las plantas (Faizan et al., 2020). Varios estudios sugieren que las NPs-ZnO tienen la capacidad de mejorar el crecimiento en diferentes especies de plantas. La germinación de semillas aumenta con la aplicación de NPs-ZnO en concentraciones bajas; sin embargo, pero si son altas se tiene un efecto negativo en la germinación (Raskar y Laware, 2014; Afrayeem y Chaurasia, 2017). Por ejemplo, Lin y Xing. (2007) encontraron que la aplicación de dosis altas de NPs-ZnO $>2\ 000\ \text{mg L}^{-1}$ inhibían la germinación de semillas de *Lolium perenne*. Dhoke et al. (2013) observaron que las NPs-ZnO utilizadas como fertilizante de

micronutrientes, mejoraron el crecimiento de plántulas de *Vigna radiata* y *Cicer arietinum* a concentraciones bajas, rangos de 1-20 mg L⁻¹.

Los nanomateriales pueden poseer características físicas y químicas únicas que les otorgan propiedades antibacterianas y antifúngicas o de protección a la radiación UV, las cuales han abierto la posibilidad de uso en la agricultura para la promoción del crecimiento de los cultivos, como fertilizantes o pesticidas. Sin embargo, la química, el tamaño y el hecho de ser menos biodegradable causa preocupación por las consecuencias ecotoxicológicas (Makirita et al., 2020a). Los estudios publicados sobre el efecto en la supervivencia y la patogenicidad de los nemátodos entomopatógenos por el contacto con nanopartículas metálicas (Makirita et al., 2020a, Taha et al., 2016) reportan no toxicidad si se usan en bajas concentraciones

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de las NP-ZnO en la supervivencia e infectividad de los nemátodos *Steinernema glaseri* y *Steinernema carpocapsae*, en condiciones de laboratorio.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Descripción del área de estudio

El experimento se realizó en el laboratorio de química del Instituto Tecnológico del Valle de Etna.

3.2.2 Materiales utilizados

Para el desarrollo del experimento se utilizaron los siguientes materiales:

1. Nanopartículas de óxido de Zinc marca Sigma-Aldrich, no. 677450.; con un tamaño de partícula < 50 nm y debido a su capacidad de protección ante la radiación UV.
2. Nemátodos entomopatógenos. Las especies *S. glaseri* cepa NJ-43 y *S. carpocapsae* cepa JAP1, las cuales forman parte de la colección del Laboratorio de Agrobiotecnología del Instituto Tecnológico del Valle de Etna. Los juveniles infectivos (JI) se producen periódicamente en larvas del último instar de la polilla de la cera *Galleria mellonella* y se almacenan a 10-12 °C en suspensión acuosa (SA) con agua destilada (AD) estéril.

3.2.3 Reproducción de nemátodos entomopatógenos

Los nemátodos en la etapa JI se produjeron por crianza masiva usando larvas de *G. mellonella* en trampas White invertidas (Kaya y Stock, 1997). Los JI cosechados se enjuagaron y concentraron en SA a una razón de 1000 JI/ML con AD estéril y se almacenaron a 10-12 °C. 24 h antes de su uso, se aclimataron a 25 °C y humedad relativa de 50 %.

3.2.4 Materiales para la formulación

El material portador para la formulación de los NEP fue tierra diatomea (marca Celite, grado 209). El alginato de sodio (marca, 6780) es un gelificante que se diluye en frío con una fuerte agitación (Mendoza, 2010). Se utilizó el glicerol ACS

(marca Fermont, Lote 043262) por la capacidad higroscópica de esta sustancia que le permite mantener la humedad por más tiempo en el interior del pellet y absorber la mayor cantidad posible de humedad ambiental (Mendoza, 2010). El glicerol y la tierra diatomea se esterilizaron a 121 °C durante 15 min.

3.2.5 Métodos experimentales. Exposición de nemátodos a NP-Ozn en suspensión acuosa

La supervivencia y la patogenicidad de los JI mantenidos en suspensión acuosa con 0, 20, 40, 200, 500 y 1500 ppm de NP-Ozn fueron evaluados. Las NP-Ozn se suspendieron en 40 ml de agua desionizada (ADI) estéril y se dispersaron utilizando un sonicador ultrasónico (AcmeSonic-Model A2L- 60 W) a 30° C durante 30 min. Luego, se tomaron 4 ml de la suspensión de NP-Ozn y se mezcló con 1 ml de la suspensión de nemátodos con 5000 JI/ml, para obtener una suspensión de NP-Ozn/NEP con 1000 JI/ml. Las suspensiones se almacenaron en oscuridad a 25 °C y humedad relativa de 50 % durante 5 semanas. El experimento se realizó por triplicado. Las combinaciones NP-Ozn/NEP que presentaron la mayor variabilidad en supervivencia e infectividad fueron seleccionadas para realizar los experimentos de exposición a radiación UV y de formulación en pellets, a fin de explorar los posibles efectos sobre los JI.

3.2.6 Exposición de nemátodos a radiación ultravioleta con NP-Ozn en suspensión acuosa

Se evaluó el efecto de la radiación UV sobre la supervivencia e infectividad de los JI en suspensión acuosa con 200, 500 y 1500 ppm de NP-Ozn. Las NP-Ozn

se suspendieron en ADI estéril y se dispersaron utilizando un sonicador ultrasónico a 30° C durante 30 min. Luego se tomaron 4 MI de la suspensión de NP-Ozn y se mezcló con 1 MI de la suspensión de nemátodos con 5000 JI/MI, para obtener una suspensión de NP-Ozn/NEP con una concentración final de 1000 JI/MI. Las suspensiones con los JI se expusieron a la radiación UV de una lampara de 235.7 nm (Heal Force – moedel AlphaClean 1300) durante 10 y 20 min. Como controles se establecieron tratamientos sin exposición a radiación UV y, con y sin NP-Ozn. El experimento se realizó por triplicado.

3.2.7 Formulación de nemátodos en pellets de tierra diatomea-gel con NP-Ozn

Los nemátodos *S. glaseri* y *S. carpocapsae* se formularon en pellets con las tres mayores concentraciones de NP-Ozn. El contenido promedio de nemátodos fue de 1000 JI/pellet. El método de formulación de nemátodos en pellets de TD-gel con NP-Ozn, fue el de gelación iónica. Las NP-Ozn se dispersaron en ADI estéril utilizando un sonicador ultrasónico.

El tratamiento de control consistió en una suspensión acuosa de JI en agua destilada sin NP-Ozn. Los contenidos de cada componente utilizado en la preparación de las mezclas para la elaboración de los pellets (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1. Componentes de la formulación de pellets de TD-gel con 1000 JI de *S. glaseri* y *S. carpocapsae* y NP-Ozn.

Nemátodo entomopatógeno	NP-Ozn (ppm)	TD (g)	Alginato de sodio (g)	Glicerol (MI)	Suspensión de JI (MI)	Agua Destilada (MI)
<i>S. glaseri</i> NJ-43	0	1	0.2	1.8	3	14
	200	1	0.2	1.8	3	14

	500	1	0.2	1.8	3	14
	1500	1	0.2	1.8	3	14
	SA (Control)	0	0	0	3	17
	0	1	0.2	1.8	3	14
	200	1	0.2	1.8	3	14
S.	500	1	0.2	1.8	3	14
<i>carpocapsae</i>	1500	1	0.2	1.8	3	14
JAP1	SA (Control)	0	0	0	3	17

NP-Ozn: nanopartículas de óxido de zinc; TD: tierra diatomea; SA: suspensión acuosa.

Después de la elaboración, los pellets se transfirieron a frascos ámbar de 0.5 L con tapa y se almacenaron a 25 y 50 % HR durante 14 semanas.

3.2.8 Determinación de la supervivencia

En el experimento de exposición de NEP a las NP-Ozn en suspensión, se tomó una muestra de 0.1 ml de la suspensión y se transfirió a un portaobjetos. Los JI se examinaron a través de un microscopio estereoscópico y se contabilizaron los individuos vivos y muertos. Se tomaron tres muestras de cada réplica del tratamiento y de cada muestra se realizaron 5 repeticiones. Esta determinación se realizó cada siete días durante cinco semanas.

En el ensayo de supervivencia de los NEP expuestos a radiación UV, 24 h después de la exposición de los NEP a radiación UV se contabilizó una sola vez la supervivencia, la cual consistió en tomar una muestra de 0.1 ml de la suspensión y se colocó en un porta objetos. Los JI se examinaron a través de un microscopio estereoscópico y se contabilizaron los individuos vivos y muertos.

Se tomaron tres muestras de cada réplica del tratamiento y de cada muestra se realizaron tres repeticiones.

En el ensayo de supervivencia de los NEP formulados, se tomó un pellet al azar, se transfirió a un pocillo de una caja de cultivo de 12 pocillos y se disgregó con 2 MI de una solución de citrato de sodio 1% (p/v). Después de 24 h, se tomó una muestra de 0.1 MI de la dilución del pellet y se colocó sobre un portaobjetos. Los JI se examinaron a través de un microscopio estereoscópico y se contabilizaron los individuos vivos y muertos. Se seleccionaron tres pellets al azar por cada tratamiento y de cada pellet disgregado se tomaron cinco muestras. Esta determinación se realizó cada siete días durante 13 semanas.

3.2.9 Bioensayo de infectividad

El ensayo de infectividad de los NEP expuestos a las NP-OZn se realizó en pocillos de una placa de cultivo de 12 pocillos. En cada pocillo se colocó un disco de papel filtro estéril y una larva de *G. mellonella*, se agregó una muestra de la suspensión de NP-OZn/NEP que contenía 20 JI vivos. La mortandad de las larvas se determinó 72 h después de la inoculación, tomando como signo de infección el cambio uniforme de la coloración de la larva, marrón oscuro para *S. glaseri* y marrón claro para *S. carpocapsae*.

En el ensayo de infectividad de los NEP expuestos a radiación UV se realizó en pocillos de una placa de cultivo de 12 pocillos. En cada pocillo se colocó un disco de papel filtro estéril y una larva de *G. mellonella*, se agregó una muestra de la

suspensión de NP-OZn/NEP que contenía 20 JI vivos. La mortalidad de las larvas se determinó 72 h después de la inoculación, tomando como signo de infección el cambio uniforme de la coloración de la larva, marrón oscuro para *S. glaseri* y marrón claro para *S. carpocapsae*. Se realizó un solo conteo de supervivencia para este ensayo.

El ensayo de infectividad de los NEP formulados en pellets sobre larvas de *G. mellonella* consistió en agregar los pellets elegidos al azar en un pocillo de una caja de cultivo de 12 pocillos, se disgregó con 2 mL de solución de citrato de sodio y se agito orbitalmente por 24 h. En otra caja y en cada pocillo se colocó un disco de papel filtro estéril, se agregó una muestra de la dilución del pellet que contenía 20 JI vivos y se transfirió una larva. La mortalidad de las larvas se verificó 72 h después de la inoculación. En los tres tipos de bioensayos, se usaron 10 larvas como unidad experimental y se realizaron por triplicado.

3.2.10 Diseño experimental

Para el caso de la exposición de NEP a las NP-OZn en suspensión, en el experimento se tomó una muestra de 0.1 mL de la suspensión y se transfirió a un portaobjetos. Los JI se examinaron a través de un microscopio estereoscópico y se contabilizaron los individuos vivos y muertos. Se tomaron tres muestras de cada réplica del tratamiento y de cada muestra se realizaron cinco repeticiones. Esta determinación se realizó cada 7 días durante 5 semanas.

En el experimento 2, la supervivencia de los NEP expuestos a radiación UV, 24 h después de la exposición de los NEP a radiación UV se determinó la supervivencia, tomando una muestra de 0.1 mL de la suspensión y se colocó en un porta objetos. Los JI se examinaron a través de un microscopio estereoscópico y se contabilizaron los individuos vivos y muertos. Se tomaron tres muestras de cada réplica del tratamiento y de cada muestra se realizaron tres repeticiones.

Para la supervivencia de los NEP formulados; en el experimento 2 se tomó un pellet al azar, se transfirió a un pocillo de una caja de cultivo de 12 pocillos y se disgregó con 2 mL de una solución de citrato de sodio 1% (p/v). Después de 24 h, se tomó una muestra de 0.1 mL de la dilución del pellet y se colocó sobre un portaobjetos para contabilizar los JI vivos a través de la observación con un microscopio estereoscópico. Se seleccionaron tres pellets al azar por cada tratamiento y de cada pellet disgregado se tomaron cinco muestras. Esta determinación se realizó cada siete días durante 13 semanas.

3.2.11 Análisis estadístico

La supervivencia de los NEP expuestos a NP-Ozn y formulados en pellets se analizó con el método de Kaplan-Meier y la prueba Log-Rank ($P < 0.05$). El análisis de varianza (ANOVA) en rangos y la prueba de Tukey ($P < 0.05$) fueron realizados para determinar la diferencia estadística en la supervivencia de los NEP expuestos a radiación UV y la infectividad sobre *G. mellonella*, bajo sus correspondientes experimentos. Todos los análisis se realizaron con el software SigmaPlot® 12 (Systat Software, Inc, San José, CA, USA.).

3.3 Resultados

3.3.1 Supervivencia de juveniles infectivos expuestos a NP-Ozn

A través del tiempo, se observa una mayor variación de la supervivencia del nemátodo *S. glaseri* en los cinco tratamientos establecidos, comparado con *S. carpocapsae*. No obstante, para el día 35, la tasa de supervivencia de *S. glaseri* se mantiene arriba del 0.8, mientras que para *S. carpocapsae* es significativamente más variable, de 0.4 a 0.95. La Figura 3.1 muestra la variación de la tasa de supervivencia de los JI de las especies *S. glaseri* y *S. carpocapsae* en suspensión con distintas concentraciones de NP-Ozn, durante 35 días.

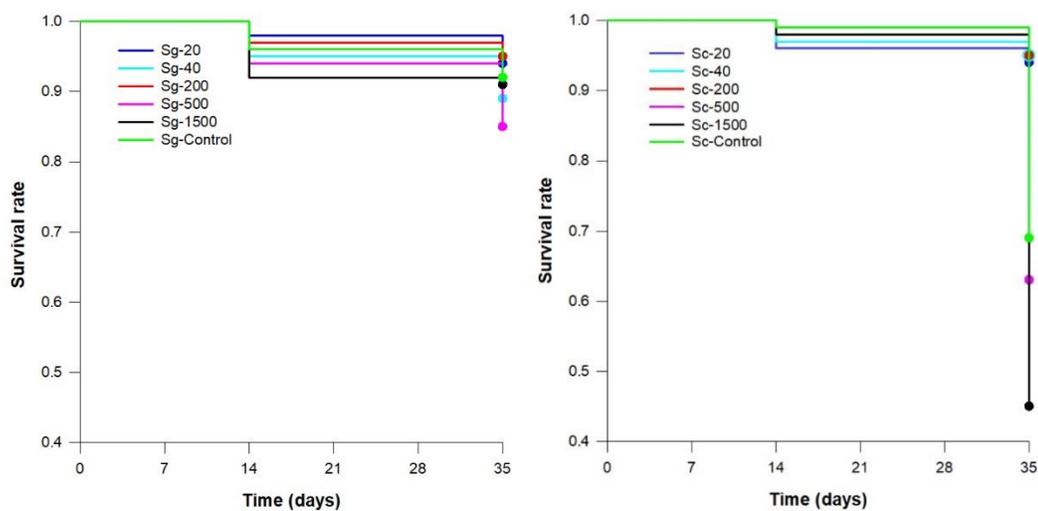


Figura 3.1. Supervivencia de los nemátodos *S. glaseri* y *S. carpocapsae* en suspensión acuosa expuestos a NP-Ozn.

El tiempo de supervivencia medio de *S. glaseri* expuesto a las cinco diferentes concentraciones de NP-Ozn va de 33.32 a 34.58 días; en tanto que para *S. carpocapsae* de 34.16 a 34.58 días. Aunque el tiempo medio parece similar, el estadístico Log-Rank de las curvas de supervivencia en relación a las

concentraciones de NP-Ozn es de $\chi^2 = 117.452$ ($P < 0.001$) para *S. carpocapsae* y de $\chi^2 = 7.932$ ($P = 0.16$) para *S. glaseri*. Por lo tanto, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones a las que *S. carpocapsae* fue expuesto.

3.3.2 Efectividad de juveniles infectivos expuestos a NP-Ozn

La infectividad de *S. carpocapsae* varía del 90 al 100%, mientras que el nemátodo *S. glaseri* es infectivo en un rango más amplio que va de 70 a 100%. El porcentaje de mortalidad de las larvas de *G. mellonella* enfrentadas contra los nemátodos *S. carpocapsae* y *S. glaseri* mantenidos durante 35 días en suspensión acuosa con NP-Ozn se muestran en la Figura 3.2.

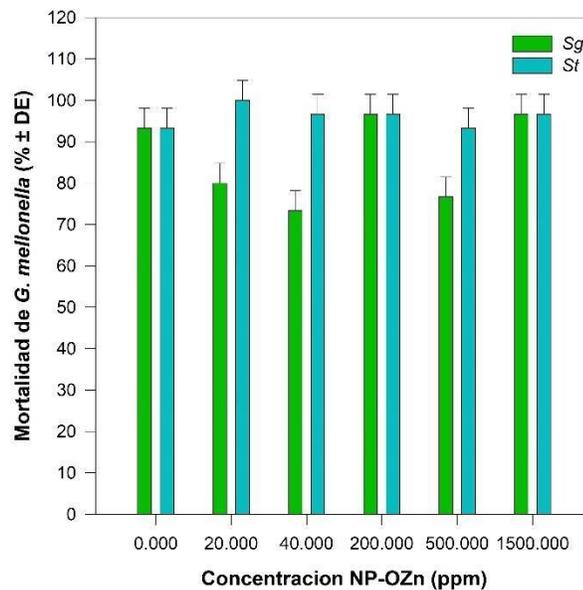


Figura 3.2. Mortalidad de *G. mellonella* por el enfrentamiento con JI de *S. carpocapsae* y *S. glaseri*.

El análisis estadístico muestra la infectividad entre nematodos *S. glaseri* y *S. carpocapsae*, son estadísticamente diferentes en los siguientes tratamientos: 20 ppm: t (2.939), P (0.007), 40 ppm: t (3.429), P (0.002), y los tratamientos que no tuvieron diferencia estadísticamente significativa fueron: 0 ppm: t (0.000), P (1.000), 200 ppm: t (0.000), P (1.000), 1500 ppm t (0.000), P (1.000).

3.3.3 Supervivencia de JI expuestos a radiación ultravioleta

No se observa una variación de la supervivencia de los dos NEP, ni entre las concentraciones de NP-Ozn o entre los tiempos de exposición a la luz UV. La supervivencia de las dos especies se mantuvo próxima a 100 %. En la figura 3.3 se muestra la tasa de supervivencia de los JI de las especies *S. carpocapsae* y *S. glaseri* en suspensión acuosa con NP-Ozn, 24 h después de su exposición a radiación UV.

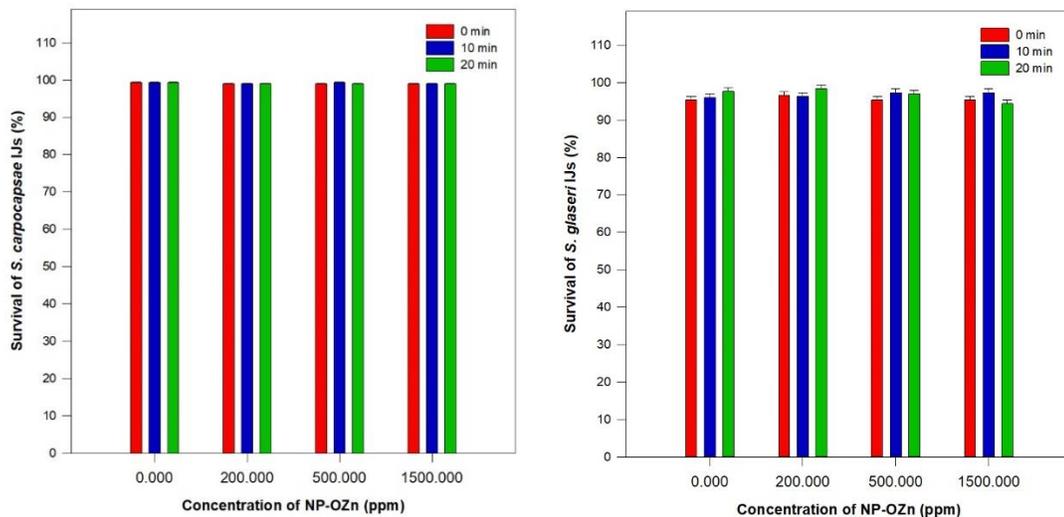


Figura 3.3. Supervivencia de *S. carpocapsae* y *S. glaseri* expuestos a luz UV.

El porcentaje de supervivencia de *S. glaseri* con tres diferentes concentraciones de NP-Ozn, expuestos a luz UV varía de 94.33 a 98.33 %; en tanto para *S. carpocapsae* va de 99 a 99.33 %. En el ANOVA, el único que mostró una diferencia estadísticamente significativa fue NEP ($P < 0.001$). Para el factor concentración de NP-Ozn se obtuvo una $P = 0.332$ y para el factor tiempo de exposición una $P = 0.164$. Por lo tanto, no existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración de NP-Ozn o por el tiempo de exposición a la radiación UV.

3.3.4 Infectividad de JI expuestos a radiación ultravioleta

En la Figura 3.4 se presenta la variación de la mortalidad de *G. mellonella* por la inoculación con 20 nemátodos *S. glaseri* previamente mantenidos en suspensiones concentradas de NP-Ozn y expuestos a radiación UV 24 h antes. La infectividad de *S. glaseri* fue de 3.33 a 73.33 %.

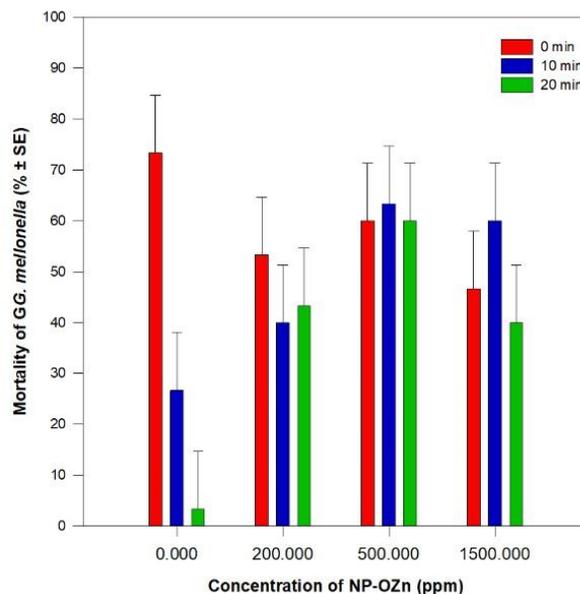


Figura 3.4. Mortalidad de *G. mellonella* por el enfrentamiento con JI *S. glaseri* expuestos a radiación UV.

En el caso de *S. carpocapsae* las NP-OZn fueron tóxicas y afectaron la infectividad de los nemátodos, no se obtuvieron datos al exponerlos contra las larvas de *G. mellonella*.

3.3.5 Efecto de la adición de NP-Ozn en la supervivencia de JI pelletizados

El tiempo de supervivencia medio por la pelletización de tres diferentes concentraciones de NP-Ozn va de 73.78 a 88.20 días para *S. carpocapsae*, y de 64.54 a 100.94 días para *S. glaseri*. La variación de la tasa de supervivencia de los JI *S. carpocapsae* y *S. glaseri* formulados en pellets con distintas concentraciones de NP-Ozn, durante 14 semanas se muestra en la figura 3.6 y en la figura 3.5 se muestra la forma inicial de los pellets de TD-gel



Figura 3.5. Vista superior de los pellets de TD-gel con NEP elaborados por el método de gelación iónica.

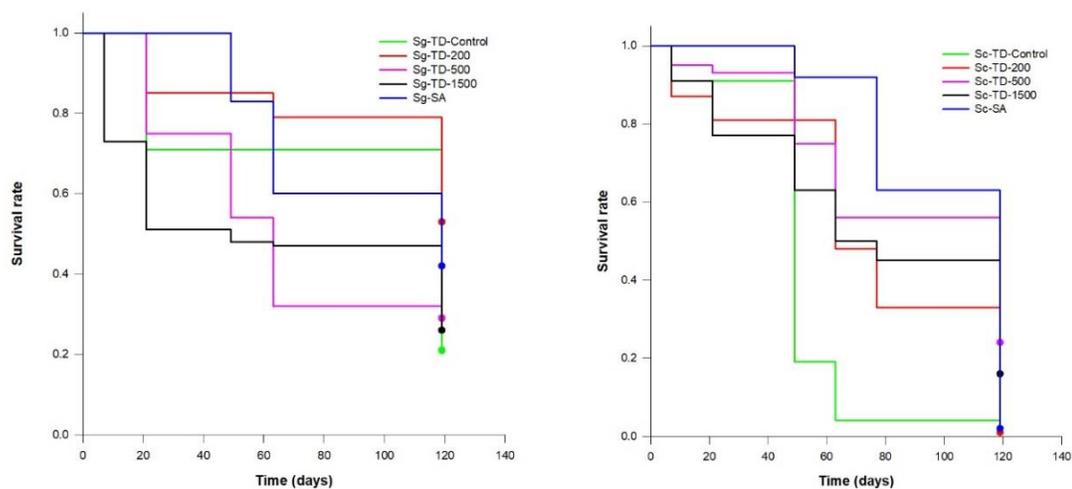


Figura 3.6. Tasa de supervivencia de los nemátodos *S. glaseri* y *S. carpocapsae* formulados en pellets de TD-Gel.

Por un lado, las curvas de supervivencia entre nemátodos *S. carpocapsae* y *S. glaseri*, son estadísticamente diferentes en los siguientes tratamientos: control: statistic (10.182), P Value (0.0321), sin nanopartículas: statistic (52.408) P Value (1.804) y con 200 ppm: statistic (69.218) P Value (4.663), y los tratamientos que no tuvieron diferencia estadísticamente fueron: 500 ppm: statistic (2.065), P Value (0.732) y 1500 ppm: statistic (0.0239), P Value (0.877). Por otro lado, el estadístico Log-Rank de las curvas de supervivencia en relación a las concentraciones de NP-OZn es de $\chi^2 = 131.993$ ($P < 0.001$) para *S. carpocapsae* y de $\chi^2 = 42.138$ ($P > 0.001$) para *S. glaseri*, por lo tanto, existe una diferencia estadísticamente significativa en la variable respuesta supervivencia, la cual depende de la concentración de NP-OZn que acompaña a *S. carpocapsae* y *S. glaseri* en los pellets.

3.3.6 Efecto de la adición de NP-Ozn en la infectividad de JI pelletizados.

Los tratamientos que mostraron las infectividades más destacadas fueron: 1. el pellet con el nemátodo *S. carpocapsae* y NP-Ozn en la concentración de 500 ppm (77%), y 2. el pellet con el nemátodo *S. glaseri* y NP-Ozn en la concentración de 1500 ppm (67%). Con ambos nemátodos, los mejores porcentajes de infectividad conseguidos por los nemátodos pelletizados son mejores o similares a los conseguidos por su control. En el cuadro 3.2 se presenta el porcentaje de infectividad de los nemátodos *S. glaseri* y *S. carpocapsae* sobre *G. mellonella*, 14 semanas después de haber sido formulados en pellets de tierra diatomea-gel.

La comparación estadística de la infectividad por el factor NEP muestra que no hay una diferencia estadística significativa (Holm-Sidak, $P < 0.05$) en la efectividad si se inocula *S. glaseri* o *S. carpocapsae* sobre el insecto de ensayo. Es decir, la mortalidad de *G. mellonella* sería la misma. En cuanto a las interacciones, solo es estadísticamente significativa para la combinación NEP & Día, específicamente, en los niveles de concentración de 0 y 500 ppm de NP-Ozn ($P < 0.001$).

Cuadro 3.2. Porcentaje de infectividad de los nemátodos *S. glaseri* y *S. carpocapsae* formulados en pellets de TD-gel con NP-Ozn, sobre larvas de *G. mellonella*.

Nemátodo Entomopatógeno	Concentración de NP-Ozn (ppm)	Tiempo después de la formulación (semanas)							Infectividad media (% ± EE)
		2	4	6	8	10	12	14	
<i>S. glaseri</i> NJ43	1500	80	53	70	47	55	62	45	60.35 ± 1.67
	500	100	13	60	47	5	31	50	45.52 ± 6.46
	200	76	34	76	52	25	50	45	53.23 ± 2.85
	0	70	10	36	47	45	31	20	38.76 ± 3.64
	SA (Control)	80	33	46	20	5	50	10	37.64 ± 5.84
<i>S. carpocapsae</i> JAP1	1500	50	83	50	52	10	68	40	52.29 ± 3.66
	500	60	83	90	23	70	56	45	64.11 ± 3.11
	200	70	73	73	52	55	26	35	58.05 ± 2.66
	0	0	13	50	35	15	50	25	25.70 ± 3.24

SA (Control)	90	86	56	11	25	18	10	48.64 ± 6.97
--------------	----	----	----	----	----	----	----	--------------

SA: suspensión acuosa; NP-Ozn: nanopartículas de óxido de Zinc.

3.4 Discusión

Este estudio reporta la supervivencia y la infectividad de los nemátodos JI de *S. carpocapsae* y *S. glaseri* expuestos a NP-Ozn, tanto en suspensión acuosa como formulados en pellets de TD-Gel, almacenados a 25 ± 1 °C y 50 % HR, por un periodo de 98-119 días. En este estudio, se utilizó *G. mellonella* como insecto hospedador para la prueba de infectividad de los NEP. Este insecto es susceptible a una amplia gama de especies de los NEP y se ha utilizado con éxito para determinar los efectos de la UV en la infectividad de los NEP en varios estudios (Grewal et al., 2002, Shapiro-Ilan et al., 2015).

Los estudios publicados sobre el efecto en la supervivencia y la patogenicidad de los nemátodos entomopatógenos por el contacto con nanopartículas metálicas (Makirita et al., 2020a, Taha et al., 2016) reportan no toxicidad si estas se usan en bajas concentraciones. En particular, las NP-Ozn protegieron a los nemátodos contra la radiación UV, pero afecto negativamente la infectividad de *S. carpocapsae*, ya que no hubo mortalidad de las larvas de *G. mellonella*.

El desarrollo de formulaciones gelificadas con NEP y NP metálicas no se ha reportado en la literatura científica. Recientemente, se reportaron dos estudios en los cuales se presenta una nueva formulación con NP y aceite mineral, el cual, a través de emulsiones Pickering de aceite en agua se puede hacer el

recubrimiento del JI para otorgarle protección ante la radiación UV (Makirita et al., 2020a). En el cuadro 3.3 se muestra la comparación de los resultados de esta investigación con otras respecto a la supervivencia y la infectividad de *S. glaseri* y *S. carpocapsae*. La supervivencia es menor a la reportada para el nemátodo *S. carpocapsae* expuesto a >50 mg/L de NP-Ozn (Makirita et al., 2020a) y *S. carpocapsae* (Nemastar) expuesto a 2 % de NP- TiO₂ (Kotliarevski et al., 2022), semejante a la supervivencia de *S. arenarium* expuesto a 20-1500 ppm de NP-Ag (Taha y Abo-Shady, 2016). Una diferencia importante en esta investigación es el tiempo de evaluación, ya que en otras investigaciones el tiempo máximo fue de 30 días. Para la infectividad de *S. glaseri* y *S. carpocapsae* sobre *G. mellonella* es menor a la de *S. carpocapsae* y *S. arenarium* y *S. carpocapsae* expuesto a 0.5-10 ppm de NP-Ozn.

Resultó interesante que más IJ formulados con NP-Zno invadieran insectos en el tratamiento UV de 20 minutos en comparación con el tratamiento sin UV, a pesar de que la viabilidad de los 1J era similar. Esto se debió probablemente a que la radiación UV actuó como un estresor para los nematodos, que optaron por invadir rápidamente al hospedador como estrategia para superar el riesgo potencial de perder infectividad. En el proceso de infección suele intervenir un grupo de nematodos, formado por los IJ de la manada que evalúan el riesgo de forrajeo y lideran la invasión, y luego los 1J restantes les siguen e invaden rápidamente antes de que disminuya la calidad del hospedador (Endogan et al., 2021; Futhing et al., 2008).

Es evidente que el aumento de la concentración de NP y el tiempo de evaluación tenga una relación lineal con el porcentaje de supervivencia o la infectividad de los NEP evaluados en este u otros estudios.

Cuadro 3.3. Supervivencia e infectividad de NEP expuestos a diferentes NP, formulados y no formulados.

NEP	NP	Concentración (ppm)	Formulación	Tiempo de supervivencia (días)	Tasa de supervivencia (%)	Infectividad (%)	Referencia
<i>S. feltiae</i>	Au	0.5 2 5	Suspensión acuosa	5	78	93	Kucharska et al. (2011)
<i>S. erenarium</i> <i>S. abbasi</i>	Ag	20 40 200 500 1500	Suspensión acuosa	5	58	98	Taha y Abo-Shady (2016)
<i>S. carpocapsae</i>	TiO ₂	2%	Emulsión Pickering	30	100	98	Kotliarevski et al. (2022)
<i>S. feltiae</i>	Ag	0.5 2 5	Suspensión acuosa	7	43	17	Kucharka et al. (2016)
<i>S. carpocapsae</i>	ZnO, TiO ₂ FeO ₄	50 100 150 200	Suspensión acuosa	1	ZnO: 75 TiO ₂ : 86 FeO ₄ : 90	ZnO: 74 TiO ₂ : 82 FeO ₄ : 86	Makirita et al. (2020a)
<i>S. carpocapsae</i> All	Silica	0.5%	Pickering emulsion Gel	4	40	50	Ramakrishnan et al. (2023)
<i>S. glaseri</i> NJ43	OZn	200 500 1500	Pellet de TD-Gel	119	53 29 26	51 43 58	Este estudio
<i>S. carpocapsae</i> JAP1	OZn	200 500 1500	Pellet de TD-Gel	119	1 23 16	54 61 50	Este estudio

3.5 Conclusiones

El uso de NP-Ozn en la formulación de nemátodos *S. glaseri* NJ43 y *S. carpocapsae* JAP1 ha demostrado ser beneficioso para aumentar el tiempo de supervivencia, llegando hasta los 119 días, lo cual triplica los resultados obtenidos en otros estudios. Además, se observó una tasa de supervivencia del 40% para *S. glaseri* y del 20% para *S. carpocapsae*. Estos nemátodos también mostraron una mejora en la infectividad sobre larvas de *G. mellonella*, con un promedio del 50% para *S. glaseri* y del 45% para *S. carpocapsae* hasta el día 119 en condiciones de laboratorio.

La mortalidad de las larvas de *G. mellonella* fue variada en los nematodos con concentraciones más altas de NP-Ozn, sin embargo, los datos no mostraron significancia. La infectividad y reproductividad de los NEP al ingresar a su hospedero se vio afectada por las concentraciones más altas de NP-Ozn en comparación con el grupo de control

Los NEP como agentes de control biológico formulados en pellets de TD-Gel, mejoraran sus aptitudes infectivas por la protección ante la radiación UV que otorgan las NP-Ozn. La máxima supervivencia media de los nemátodos pelletizados fue de 88.20 días para *S. carpocapsae* JAP1 y de 100.94 días para *S. glaseri* NJ43, con 500 y 200 ppm de NP-OZn, respectivamente, con infectividad media de 51 a 61.9%.

Respecto a la caracterización de la toxicidad y los efectos de las NP-OZn para los nemátodos *S. carpocapsae* y *S. glaseri* expuestos a NP-Ozn en suspensión

acuosa, exposición a radiación ultravioleta con NP-Ozn en suspensión acuosa y formulados en pellets de tierra diatomea-gel con NP-Ozn; se encontró que las NP-Ozn no son tóxicas para los nematodos, especialmente para la supervivencia e infectividad.

3.6 Literatura citada

- Afrayem, S. M. and Chaurasia, A. K. (2017). Effect of zinc oxide nanoparticles on seed germination and seed vigour in chilli (*Capsicum annuum* L.). *J. Pharmacogn. Phytochem.* 6(5):1564-1566.
- 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.
- Cruz-Martínez, H. Ruiz-Vega, J. Matadamas-Ortiz, 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.
- Dhoke, S. K. Mahajan, P. Kamble, R. and Khanna, A. (2013). Effect of nanoparticles suspension on the growth of mung (*Vigna radiata*) seedlings by foliar spray method. *Nanotechnol. Development.* 3(1):e1-e1. <https://doi.org/10.4081/nd.2013.e1>.
- Faizan, M. Hayat, S. and Pichtel, J. (2020). Effects of zinc oxide nanoparticles on crop plants: a perspective analysis. *Sustainable Agriculture Reviews.* (41):83-99. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-33996-8-4>.

- Grewal, P.S. Wang, X. Taylor, R.A.J.,(2002). Dauer juvenile longevity and stress tolerance in natural populations of entomopathogenic nematodes: Is there a relationship? *International. J. Parasitol.* 32, 717-725.
- Kotliarevski, L. Cohen, R. Ramakrishnan, J. Wu, S. Mani, K. A. Amar-Feldbaum, R. & Mechrez. G. (2022). Individual coating of entomopathogenic nematodes with titania (TiO₂) nanoparticles based on oil-in-water Pickering emulsion: A new formulation for biopesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(42), 13518-13527.
- Kucharska, K. Zajdel, B. Pezowicz, E. Jarmul-Pietraszczyk, J. Mazurkiewicz, A. N. N. A. & Tumialis, D. (2016). Control of the lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* entomopathogenic nematodes (EPNs) combined with nanoparticles. *Annals of Warsaw University of Life Sciences-SGGW. Animal Science*, 55.
- Lin, D. and Xing, B. (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*. 150(2):243-250. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.01.016>.
- Makirita, W. E. Yong, L. He, N. Mbega, E. R. Chacha, M. Li, X. & Zhang, F. (2020a). Effects of nanoparticles of metal oxides on the survival of the entomopathogenic nematode: *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 20(3), 1434-1439.
- Raskar, S. V. and Laware, S. L. (2014). Effect of zinc oxide nanoparticles on cytology and seed germination in onion. *Inter. J. Current Microbiol. Appl. Sci.* 3(2):467-473.

Shapiro-Ilan, D. I. Haizir, S. Lete, L. (2015). Viabilidad y virulencia de nematodos entomopatógenos expuestos a radiación ultravioleta . J Nematol. 47. 184-189.

Taha, E. H. & Abo-Shady, N. M. (2016). Effect of silver nanoparticles on the mortality pathogenicity and reproductivity of entomopathogenic nematodes. International Journal of Zoological Research, 12(3), 47-50.

CAPÍTULO IV

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Arunthirumeni, M., Veerammal, V. & Subramanian, M. (2022). Biocontrol efficacy of mycosynthesized selenium nanoparticle using *Trichoderma sp.* On insect pest *Spodoptera litura*. *Journal of Cluster Science*, 33: 1645-1653.
- Asaff, T. A., Reyes, V. Y., Lopez, L. V. E. y De La Torre, M. M. (2002). Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. *Avance y Perspectiva*, v. 21, p. 291-295.
- Baimey, H., Zadji, L., Afouda, L., Moens, M. & Decraemer, W. (2015). Influence of pesticides, soil temperature and moisture on entomopathogenic nematodes from southern Benin and control of underground termite nest populations. *Nematology*, 17, 1057-1069.
- Barra, R. J.E. & Del Rincón, C. M.C. (2010). Insect viruses diversity, biology, and use as bioinsecticides. *Tropical Biology and Conservation Management*.
- 3.IBurgos, E. A. (2017). Efecto del ataque de nematodos entomopatógenos nativos del género *Steinernema* sobre el gusano

- cortador de la papa (*Agrotis bilitura* Guenée). Universidad de Chile Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. <https://bit.ly/3nZhVJW>
- Cakmak, I. y K, U. B. (2017). Biofortificación agronómica de cereales con zinc: una revisión. *Rev. Europea. Cienc. Suel.* 69(1):172-180.
- Caballero, P. y Williams, T. (2008). Virus entomopatógenos. Control Biológico de plagas agrícolas. *De Jacas J A y Urbaneja A. Phytoma S. A., Valencia, España.* 121-135.
- Cabané, P., Alvo, A., Neira, A., Caviedes, P y Gace, P. (2011). Microencapsulación de células y tejido para terapia celular. *Revista chilena de cirugía* 63(1):110-113
- Cano, M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una Revisión. *Actualidad & Divulgación Científica Act. & Div. Cient.* 14(2): 15-31. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012342262011000200003&script=sci_abstract&tlng=es.
- Cook, R.J. (1988). Biological control and holistic plant-health care in agriculture. *American Journal of Alternative Agriculture* 3(2/3). Pp. 51-62.
- Cortés. M. C. I. & Chavarría-Hernández, N. (2020). Production of entomopathogenic nematodes insubmerged monoxenic culture: A review. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(12), 3968-3985.
- Chandra, P., Sharma, R. K. & Arora, D. S. (2020). Antioxidant compounds from microbial sources: a review. *Food Res. Int.* 129 p.

- Cho, K., Wnag, X., Nie, S., Chen Z. & Shin D. (2008). Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(5): 1310-1316. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1441>
- Cruz, M. H., Ruiz V. J., Matadamas, O. P. T., Cortés, Martínez. C. I. & Rosas-Díaz, J. (2017). Formulation of Entomopathogenic Nematodes for Crop Pest Control – a Review. *Plant Protect. Sci.* 53(1):15-24.
- Eilenberg, J., Hajek, A. & Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46:387-400.
- Espinosa, R. M. (2005). Diseño de una máquina para encapsular nematodos Entomopatógenos. Tesis de Ingeniero Mecánico Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. 115 p.
- Faizan, M., Faraz, A., Yusuf, M., Khan, S. T. & Hayat, S. (2018) Zinc oxide nanoparticle-mediated changes in photosynthetic efficiency and antioxidant system of tomato plants. *Photosynthetica* 56: 678-686.
- FAO. (2020). Agroecology in Europe and Central Asia – an overview. Budapest. Available at <https://doi.org/10.4060/ca8299en> (accessed on 5 May 2021).
- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. y Ball, L. A. (2005). Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV. Elsevier / Academic Press. London.
- García, G. C., Obrador, A., González, D., Babín, M. & Fernández MD. (2017). Comparative effect of ZnO NPs, ZnO bulk and ZnSO₄ in the antioxidant defenses of two plant species growing in two agricultural soils under greenhouse conditions. *Science of the Gerling, D.* 1986. Natural enemies of *Bemisia tabaci*, biological characteristics and potential as biological

control agents: a review. *Agriculture, Ecol Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.*

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 CIIDIROaxaca. México.

Goud, S., Hugar, P. S. & Prabhuraj, A. (2010). Effect of temperature, population density and shelf life of EPN *Heterorhabditis indica* (RCR) in sodium alginate gel formulation. *Journal of Biopesticides* 3(3):627-632.

Grewal, P. S. (2002). Formulation and application technology. In Gaugler R. (ed.). *Entomopathogenic Nematology*. Oxfordshire, USA, CABI. p. 265-287.

Griffin, C., Boemare, N. & Lewis. E. (2005). Biology and behaviour. In: P. Grewal, R.-U. Ehlers and D. Shapiro-Ilan (Eds.). *Nematode as Biocontrol Agents*. CABI Publishing. Wallingford, U.K. 47-59.

Hao, Y., Yuan, W., Ma, C., White, J., Zhang, Z., Adeel, M., Zhou, T., Rui, Y., & Xing, B. (2018). Engineered nanomaterials suppress Turnip mosaic virus infection in tobacco (*Nicotiana benthamiana*). *Environmental Science: Nano*, 5: 1685-1693.

Hiltbold, I. (2015). Prospects in the application technology and formulation of entomopathogenic nematodes for biological control of insect pests. In R. Campos-Herrera (Ed.), *Nematode pathogenesis of insects and other pests* (pp. 187-205). Switzerland: Springer, Cham.

Hussein, M. & Abdel, A. M. A. (2012). Formulation of two native entomopathogenic nematodes at room temperature. *Journal of Biopesticides* 5:23-27.

- Iskandar, F. (2009). Nanoparticles processing for optical applications – A review. *Advanced Powder Technology*, 20, 283-292.
- Jisha, V. N., Smitha, R. B. & Benjamin, S. (2013). An overview on the crystal toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Advances in microbiology*, 3, 462-472. Doi:10.4236/aim.2013.35062.
- Jurat, F. J. & Jackson, T. (2012). Bacterial entomopathogens. *Insect pathology*, 2, 265-349. Doi:10.1016/B978-0-12-384984-7.00008-7.
- Kaya, H. K. (1990). Soil Ecology. In R. Gaugler & H. K. Kaya (Eds.), *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control* (pp. 93-98). Florida, *United States*: CRC Press.
- Kaya, H. K. & Nelsen, C. E. (1985). Encapsulation of Steinernematid and Heterorhabditid nematodes with calcium alginate: a new approach for insect control and other applications. *Environmental Entomology* 14:572-574.
- Kah, M., Tufenkji, N. & White J. C. (2019). Nano-enabled strategies to enhance crop nutrition and protection. *Nature nanotechnology* 14: 532-540.
- Kausar, A., Hussain, S., Javed, T., Zafar, S. Anwar, S., Hussain, S. & Saqib, M. (2023). Zinc oxide nanoparticles as potential hallmarks for enhancing drought stress tolerance in wheat seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 195: 341-350.
- Konappa, N., Krishnamurthy, S., Arakere, C., Chowdappa, S., Akbarbasha, R. & Ramachandrappa, N. (2021). Nanofertilizers and nanopesticides: recent trends, future prospects in agriculture. 281-230.

- Kolenčík, M., Ernst, D., Komár, M., Urík, M., Šebesta, M., Dobročka, E., Černý, I., Illa, R., Kanike, R., Qian, Y., Feng, H., Orlová, D. & Kratošová, G. (2019). Effect of foliar spray application of zinc oxide nanoparticles on quantitative, nutritional, and physiological parameters of foxtail millet (*Setaria italica* L.) under field conditions. *Nanomaterials* (Basel, Switzerland). 9(11):1559. 10.3390/nano9111559.
- Labaude, S. & Griffin, C. (2018). Review Transmission Success of Entomopathogenic Nematodes Used in Pest Control. *Insects*, 9, 72, doi:10.3390/insects9020072
- Liu, R. & Lal, R. (2015). Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Science of the Total Environment*, 514: 131-139.
- Lira, S.R. (2016). Agronano tecnología: Nueva frontera de la revolución verde. Centro de Investigación de Química Aplicada (CIQA). 273 pp.
- Lira, S. R., Méndez, A. B., Santos, V. G. & Vera, R. I. (2018). Potencial de la nanotecnología en la agricultura. *Acta univ*, 28(2): 9-24.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M. & Darnell, J. (2006). *Biología celular y molecular*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Lowry, G. V., Avellan, A. & Gilbertson, L. M. (2019). Opportunities and challenges for nanotechnology in the agri-tech revolution. *Nature nanotechnology* 14: 517-522.

- Madziva, H., Kailasapathy, K. & Phillips, M. (2005). Alginate– pectin microcapsules as a potential for folic acid delivery in foods. *Journal of Microencapsulation* 22(4):343-351.
- Makirita, W. E., Zhang, F., Mbega, E. R., He, N., Li, X., Chacha, M. & Liu, T. (2020b). Influence of Metal Oxides Nanoparticles on Pathogenicity of *Steinernema carpocapsae* Nematodes Against Lepidopteran *Galleria mellonella*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 20(3), 1470-1477.
- Makirita, W. E., Yong, L. He, N., Mbega, E. R., Chacha, M. Li, X. & Zhang, F. (2020a). Effects of nanoparticles of metal oxides on the survival of the entomopathogenic nematode: *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 20(3), 1434-1439.
- Meyling, N. V. & Eilenberg, J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological Control*, v. 43, n. 2, p. 145-155,. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.07.007>
- Moonen, A. C. & Bàrberi, P. (2008). Functional biodiversity: An agroecosystem approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 127:7-21.
- Mousavi, S. C. T., Nguyen, F. E. & Kellenberger, S. (2014). Measuring surface potential changes on leaves. *Nature Protocols*. 9(8):1997-2004. 10.1038/nprot.2014.136.
- Munir, T., Rizwan, M., Kashif, M., Shahzad, A., Ali, S., Amin, N., Zahid, R., Alam, M. F. E. & Imram, M. (2018). Effect of zinc oxide nanoparticles on the

- growth and zn uptake in wheat (*Triticum aestivum* L.) by seed priming method. *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures* 13: 315-323.
- Murray, P., Rosenthal, K. & Pfaller, M. (2009). *Microbiología médica*. (7.^a ed.). Barcelona, España, Elsevier.
- Mnif, I. & Ghribi, D. (2015). Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. *Crop Protection*, 77, 52- 64. Doi:10.1016/j.cropro.2015.07.017.
- Mujica, P. A. (2006). Formulación de la cepa S 111 de *Serratia liquefaciens* (Grimes y Hennerty 1931) Bascomb et al. 1971, en matrices de alginato y su efectividad para inhibir in vitro a *Rhizoctonia solani* Kühn. Tesis Lic. Valdivia, Chile, Universidad Austral de Chile. 120 p.
- Nagaoka, M., Shibata, H., Kimura T. I., Hashimoto, S. & AntiUlcer. (2000) Effects and Biological Activities of Polysaccharides from Marine Algae. *Biofactors*, 12: 267–274.
- Nandhini, M. R., Udayashankar, S. B., Niranjana, S. R., Søggaard, O., Shetty, H. & Prakash, H. S. (2019). Biofabricated zinc oxide nanoparticles as an eco-friendly alternative for growth promotion and management of downy mildew of pearl millet. *Crop Protection*. 121(1):103-112. 10.1016/j.cropro.2019.03.015.
- Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T. Hoek, E., Somasundaran, P., Klaessing, F., Castranova, V. & Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials* 8: 543-557.

- Numan, A. (2021). Contemporary nanomaterials in material engineering applications. 1a ed. *Springer International Publishing, Cham, Switzerland*, 343 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-62761-4>
- Patil, P., Chavanke, D., Wagh, M. (2012). "A review on ionotropic gelation method: Novel approach for controlled gastroretentive gelspheres," *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 4. URL
- Pucheta, D. M., Flores, M. A., Rodríguez, N. S., y De La Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *INCI*, v. 31, n. 12, p. 856-860.
- Rajiv, P., Rajeshwari, S. y Venckatesh, R. (2013). Bio-Fabrication of zine oxide nanoparticles using leaf extract of *Parthenium hysterophorus* L. and its size-dependent antifungal activity against plant fungal pathogens *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 112: 384-387.
- Rehman, H., Majeed, B., Aslam, M., Rasul, A., Sagheer, M., Ali, Q. & Raen, Z. (2021). Green synthesis of silver nitrate nanoparticles from *Camelina Sativa* (L.) and its effect to control insect pests of stored grains. *International Journal of Tropical Insect Sciencie*, 41: 3031-3039I.
- Rezaei, N., Karimi, J., Hosseini, M., Goldani, M. & Campos-Herrera, R. (2015). Pathogenicity of two species of entomopathogenic nematodes against the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae), in laboratory and greenhouse experiments. *J. Nematol.*, 47(1), 60.
- Rizwan, M., Ali, S., Ali, B., Adrees, M., Arshad, M., Hussain, A., Zia, R. M. & Waris, A. A. (2018). Zine and iron oxide nanoparticles improved the plant

growth and reduced the oxidative stress and cadmium concentration in heat. *Chemosphere*, 214(1):269-277. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.09.120

Rodríguez, G. N., Avilla, J., Aparicio, A. J., Gabarra, R. Riudavets, J., Alegre, S., Lordan, J., & Alins, G. (2019). The contribution of surrounding margins in the promotion of natural enemies in Mediterranean apple orchards. *Insects* 10(5), 148.

Rumbos, C. I., & Athanassiou, C. G. (2017). The use of entomopathogenic nematodes in the control of stored-product insects. *J Pest Sci.* 90:39-49

Sánchez, C. M. (2020). Microencapsulación de biocontroladores: revisión del estado del arte. Universidad de Cartagena.

San-Blas, E. (2013). Progress on entomopathogenic nematology research: A bibliometric study of the last three decades: 1980–2010. *Biological Control* 66:102-124.

Samson, R. A., Evans, H. C. & Latgé, J. P. (1998). Atlas of entomopathogenic fungi. New York: Springer-Verlag, p. 187.

Subbaiah, L. P., Tollamadugu, N. V., Gilidiará, K., Timmavajjula, S. P., Reddy, B. & Pradeep, T. N. (2016). Effects of nanoparticulate delivery of zinc on growth, productivity, and zinc biofortification in maize (*Zea mays* L.). *J. Agr. Food Chem.* 64(19):3778-3788. Doi:10.1021/acs.jafc.6b00838

Shapiro-Ilan, D. I., Gouge, D. H., Piggott, S. J. & Fife, J. P. (2006). Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control, 38(1), 124-133.

- Stadler, T., Buteler, M. & Weaver, D. (2010). Novel use of nanostructured alumina as an insecticide. *Pest Management Science*, 66(6): 577-579.
- Sturikova, H. K., Huska, D., Adam, V. (2018). Zinc, zinc nanoparticles and plants. *J. Hazardous Materials*. 349:101-110. 1016/j.jhazmat.2018.01.040.
- Taha, E. H. & Abo-Shady, N. M. (2016). Effect of silver nanoparticles on the mortality pathogenicity and reproductivity of entomopathogenic nematodes. *International Journal of Zoological Research*, 12(3), 47-50.
- Thakore, Y. (2006). The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*, 2(3), 194-208. doi:10.1089/ind.2006.2.194.
- Wang, M., Liu, X., Hu, J., Li, J. y Huang, J. (2015). El óxido nano-férrico promueve el crecimiento de la sandía. *Rev. Biomateriales y Nanobiotecnología*. 6(3):160-167. 10.4236/jbnb. 2015.63016.
- Zhao J., & Stenzel M, H. (2018). Entry of nanoparticles into cells: The importance of nanoparticle properties. *Polymer Chemistry* 9: 259-272.