

720385



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

**"AISLAMIENTO DE UN MICROORGANISMO
PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE INSECTOS"**

**MARIA LAURA SAMPEDRO ROSAS
CENOBIA SILVIA DURAN GONZALEZ**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO (BIOQUÍMICO
MICROBIÓLOGO)**

México, D. F. 1978



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Con amor a mis padres:

Maximiliano Sampedro
Carmen R. de Sampedro

Con respeto y cariño a mi tía:

Ma. de los Angeles Rosas

A mis queridos hermanos:

Guadalupe, Maximiliano, Fernando
Roberto, Carmen, Rosario y María Luisa.

A mis cuñados:

Javier, Silvia, Laura, Gabi, Gustavo,
Hector y Lalo.

A mis sobrinas:

Elisa y Laurita.

Con cariño:

Andrés

A todos mis amigos y compañeros.

A mis Profesores.

Jurado asignado según el tema:

PRESIDENTE	Prof. OSCAR AMOR DODERO.
VOCAL	Prof. ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN.
SECRETARIO	Prof. JORGE SOTO SORIA.
1er.SUPLENTE	Prof. SALVADOR MARTIN SOSA.
2°.SUPLENTE	Prof. LILIA VIERNA DE GARCIA.

Sitio donde se desarrollo el tema: DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL, FACULTAD DE QUIMICA, U.N.A.M.

Nombre completo y firma de los sustentantes:

MARIA LAURA SAMPEDRO ROSAS. Maria Laura Sampedro R
CENOBIA SILVIA DURAN GONZALEZ. Cenobia Silvia Duran Gonzalez

Asesor del tema:

Q.B.P. JORGE SOTO SORIA. Jorge Soto Soria

Con respeto e infinito agradecimiento al Dr. Raúl MacGregor por permitir y ayudar a que se hiciera posible parte de esta tesis en el Departamento de Zoología del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México; y por su valiosa colaboración.

Con estimación al Q.B.P. Jorge Soto Soria por su valiosa asesoría en la Dirección de este trabajo.

Nuestro agradecimiento:

Al Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al M.C. Javier Butze.

Por su grandiosa colaboración.

I N D I C E.

	Página
OBJETIVO -----	1
GENERALIDADES -----	2
EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO -----	13
METODOS -----	21
RESULTADOS -----	38
DISCUSION -----	79
CONCLUSIONES -----	86
BIBLIOGRAFIA -----	87

1.- OBJETIVO.

En la actualidad la humanidad se enfrenta con diversos problemas; uno de ellos es la alimentación.

La falta de alimentos puede deberse a diferentes causas, entre las más importantes, se encuentran los insectos plaga que atacan cultivos y granos almacenados, siendo destruidos en una proporción significativa.

El estudio microbiológico realizado en dos especies de insectos plaga, Sitophilus oryzae y Sitophilus granarius, causantes del deterioro de granos alimenticios tiene por objeto encontrar un microorganismo patógeno para dichas especies, con el cual se pueda llevar a cabo un control biológico de éstos, ya que ambas especies son las causantes del vaciado de los granos, tanto en cultivos como en el almacenaje de los mismos.

Por lo tanto, creemos que es de gran utilidad para la economía actual del País, efectuar estudios de este tipo; como una alternativa más, en el combate de plagas que reducen la producción de alimentos agrícolas.

2.- GENERALIDADES.

Se ha descubierto que el control biológico, de los insectos, por medio de microorganismos, ocurre normalmente en la naturaleza; siendo importante el papel que estos juegan como patógenos en el control natural. Esto ha originado el interés de los entomólogos por estudiar la manera de usar microorganismos entomógenos en el control biológico de insectos plaga que atacan los cultivos agrícolas.

Ya en el siglo XIX Pasteur realizó valiosos estudios sobre las enfermedades del gusano de seda. Los trabajos de Metchnikoff (1880) fueron seguidos por Krassiltschick (1888), quién tenía la idea de controlar los insectos por medio de epidemias artificialmente inducidas. Sin embargo, no fué sino hasta 1911-15 con los trabajos de D'Hérelle quién usó el Coccobacillus acridiorum para el control de la langosta, que se desarrolló un interés en la utilización de los microorganismos para la destrucción de insectos dañinos.

La necesidad de un mayor control biológico de in--

sectos plaga ha sido reafirmada una y otra vez por eminentes biólogos como: Steinhaus (1956), Bucher (1958), Dutky (1959), Prescott y Dunn (1959), Tanada (1959), y Hall (1961). Todos ellos han contribuido a una mejor comprensión de los factores fundamentales en relación con el uso de microorganismos en el control biológico.

A raíz de las publicaciones de Steinhaus (1956) sobre el control microbial e insecticidas vivos; la industria comenzó a mostrar interés en el uso de patógenos de insectos. Se han realizado investigaciones para perfeccionar las técnicas de producción masiva de éstos. Entre los microorganismos ampliamente usados tenemos el B.thuringiensis var. thuringiensis que ha sido seleccionado como el primer patógeno para ser ampliamente explotado debido a sus características, que lo hacen ser aceptable para adaptarse a un gran número de programas de control biológico de insectos.

Las posibilidades de usar hongos entomógenos para el control biológico de insectos plaga fueron consideradas cuando Speare y Colley (1912) reportaron el éxito en la utilización del hongo Entomophthora aulicae -

contra las larvas de la palomilla de la cola café, en Massachusetts. Unos años después Dustan (1925) introdujo especies de Entomophthoraceae en poblaciones de la chinche verde del manzano, en Nueva Escocia Canadá. Hall y Dunn (1958) utilizaron técnicas similares para diseminar hongos criados en laboratorio y recolectados en el campo para el control del pulgón manchado de la alfalfa, en California.

Las enfermedades virales han tenido un papel importante en el control natural, esto ha dado como resultado el estudio de los virus entomógenos y su potencialidad. El primer establecimiento de una enfermedad viral exótica con éxito fué logrado por Balch (1946) -- quién introdujo el virus poliédrico del Tentredinido-europeo del abeto, *Diprion hercyniae*, en New Founland. De acuerdo con Steinhaus y Thompson, los virus son un factor importante en el control natural del insecto -plaga; pero esas epizootias que se desarrollan en forma natural no ocurren con ninguna regularidad para lograr un control etonómico satisfactorio del insecto.

La utilización de enfermedades con éxito para el control de insectos depende de la biología y caracte-

rísticas de los insectos huéspedes y los microorganismos parásitos así como del medio ambiente.

Steinhaus (1956) analizó una serie de ventajas y -desventajas que ofrece el control microbiano. (8.7)

× Las principales ventajas son: *

- 1.- La naturaleza inocua y no tóxica de los patógenos de insectos para otras formas de vida con la consecuente ausencia de residuos tóxicos.
- 2.- El relativamente alto grado de especificidad de la mayoría de los patógenos, lo cual tiende a proteger a los insectos benéficos.
- 3.- La compatibilidad de muchos patógenos con muchos insecticidas hasta el grado de que los dos pueden ser usados en forma conjunta y, cuando menos en algunos casos, en forma sinérgica, dado que la infección puede originar que los insectos sean más susceptibles al envenenamiento con los productos químicos.
- 4.- La facilidad y bajo costo con que algunos patógenos pueden ser producidos.
- 5.- La gran versatilidad de los microorganismos patógenos en lo que se refiere a los métodos de aplica-

ción. Algunos microorganismos pueden ser introducidos y colonizados dando por resultado que se -- pueda obtener un control permanente. Otros patógenos pueden ser usados en aspersiones o espolvoraciones de la misja manera que los insecticidas.

6.- La aparente lentitud mediante la cual el huésped susceptible desarrolla resistencia a un patógeno microbiano.

7.- Las bajas dosis que en algunos casos se requieren para lograr el control.

Las principales desventajas son:

1.- La necesidad de una aplicación cuidadosa y a tiempo del patógeno con respecto al periodo de incubación de la enfermedad.

2.- La marcada especificidad de la mayoría de los patógenos, lo cual algunas veces disminuye el espectro de efectividad, atacando solamente una especie de insectos en casos donde varias plagas están involucradas, todas las cuales sin embargo pueden ser destruidas por un solo insecticida químico.

3.- La necesidad de mantener al patógeno en condiciones viables, de alta virulencia y en un estado du

rable o resistente hasta que se ponga en contacto con el insecto.

- 4.- La dificultad de producir algunos patógenos ya sea en grandes cantidades, a bajo precio, o ambos casos.
- 5.- La tendencia de enfermedades a originar que los insectos o partes de ellos permanezcan adheridos al follaje de la planta huésped. Esto puede ser particularmente objetable en cultivos como las hortalizas en las cuales las normas de calidad no permiten que contengan partes de insectos.
- 6.- El requerimiento en algunas enfermedades de condiciones climáticas favorables a fin de invadir e infectar a sus huéspedes.

Es pues, importante tomar en cuenta los puntos antes mencionados, cuando se quiera llevar a cabo un control biológico de insectos plaga.

Ha sido generalmente aceptado por los microbiólogos y fisiólogos, que muchos insectos albergan microorganismos benéficos. Parece ser, que los microorganismos algunas veces suplen al hospedero con vitaminas del grupo "B" (8.1). Muchas especies de insectos tie-

nen organos especiales llamados micetomas, que albergan en sus células uno o más tipos de microorganismos simbiotes ó patógenos.

El micetoma es un órgano cubierto de epitelio propio y abundantemente provisto de tráqueas, que indica la posibilidad de un metabolismo incrementado de sus células (micetocitos) hospederas de microorganismos. Los micetocitos son células agrandadas con núcleos de gran tamaño, que se encuentran pobladas por los microorganismos simbiotes o patógenos.

Existen insectos que poseen varias clases de simbiotes, que se encuentran en micetomas separados; o bien los diversos simbiotes, incluidos en sus respectivos micetocitos, pueblan diferentes partes de un único micetoma.

Con el descubrimiento de los efectos bactericidas de las sulfonamidas y de los antibióticos, se ofrecieron muchas posibilidades para liberar a los huéspedes de sus simbiotes, sea por administración oral o por inyección en el hemoceloma. Esto pudo lograrse aún en el caso de los insectos que tienen los micetocitos o micetomas respectivos lejos del tracto intestinal. Se

obtuvieron individuos libres de simbioses, de varios coleópteros y de algunos blátidos. A pesar de esta ausencia de microorganismos, las estructuras que evolucionaron para albergar y transmitir los simbioses vuelven a presentarse en dicha variedad.

Sin embargo, no siempre los microorganismos y los micetomas son beneficios para el insecto; ya que algunas veces pueden causarle trastornos y alteraciones en su organismo.

Murray y Tieg (1935) demostraron que los microorganismos podían encontrarse en el sistema reproductor de la hembra, de donde pasaban a los huevos estableciendo una cadena en los diferentes ciclos del insecto y en sus generaciones sucesivas.

Mansour (1935) pretende que en dos especies consanguíneas de gorgojo (Sitophilus oryzae y Sitophilus granarius) existen micetomas larvarios que están asociados a microorganismos simbioses en su etapa adulta, estando implantados los simbioses en el intestino medio del gorgojo.

Continuando la búsqueda de microorganismos en ambas especies de gorgojos, Lum y Baker (8.15) encontraron-

que ciertos microorganismos no eran realmente benéficos para su hospedero; ya que algunos de ellos atacaban las gonadas femeninas causandoles esterilidad.

En el caso de los microorganismos patógenos heredables, la generación que se pone en contacto con el patógeno no presenta síntomas de infección, sin embargo el microorganismo se trasmite a la generación siguiente, atacando las gonadas de las hembras, dando como resultado una esterilidad en esa generación. Desafortunadamente al causarle esterilidad a esa generación el patógeno no se puede transmitir a otras.

Musgrave y Miller (8.17) sugieren la necesidad de profundizar los estudios acerca de los microorganismos asociados con el gorgojo (Sitophilus oryzae y Sitophilus granarius) ya que estos coleópteros son una plaga primaria de los cereales, y son la causa del vaciado de los granos.

Como se sabe, actualmente el mundo enfrenta numerosos problemas; siendo uno de los principales, el agenciarse los alimentos necesarios para el sostenimiento de su población; siendo por lo tanto su preservación en bodegas y silos de gran importancia. El estu-

dio del control biológico de los insectos plaga puede ser de sumo interés como una de las soluciones para la conservación de granos alimenticios.

Tanto Sitophilus oryzae y Sitophilus granarius son plaga primaria de los cereales (arroz, sorgo, trigo y maíz), que es la causa del vaciado de los granos.

Sitophilus oryzae es más común encontrarlo en los cereales de grano pequeño y tiene una mayor tolerancia a la temperatura alta. Esta especie puede volar, por lo que ataca a los cereales en el campo antes de su recolección. En condiciones óptimas la hembra pone de 100 a 150 huevos durante un período de muchas semanas cada huevo queda puesto en un diminuto agujero que la hembra hace en el grano, por masticación, y luego queda sellado dentro del agujero por medio de una secreción. La larva carente de patas, permanece dentro del grano, donde se alimenta y finalmente pasa a la fase de pupa. Cuando el desarrollo está completo el individuo adulto se abre paso para salir del grano, masti--cando éste y deja tras de sí un agujero de salida. Tanto las larvas como los adultos se alimentan del grano. Un adulto puede vivir hasta cinco meses.

Sitophilus granarius solo posee vestigios de alas posteriores y, por lo tanto, limita su presencia en los granos almacenados y no ataca los cultivos en el campo. La vida en el adulto de esta especie puede prolongarse un lapso tan largo como de ocho meses. La hembra puede poner entre 30 y 250 huevos, al que tapona con una secreción gelatinosa. Esta especie prefiere los granos más grandes, a los que tiende a utilizar para poner en ellos sus huevos.

Mientras que S.oryzae es de distribución cosmopolita, a S.granarius lo encontramos en las tierras altas de Kenya, y puede estar presente en cereales importados de otros países. No está bien establecida su localización en los países de clima tropical.

3.- EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO.

EQUIPO.

- 3.1. Aspersor de vacío.- Esta formado de un frasco de vidrio de 4.5 x 7.0 cm., con un tapón de hule -- que contiene dos agujeros.
- a) en uno de ellos se conecta una manguera de hule con la que se aspira, con la boca, para hacer un vacío ligero, y permitir el paso de los insectos al frasco. La manguera contiene en su extremo interior una malla de plástico que impide el paso de los insectos a través de ella.
- b) en el otro agujero va conectado un tubo de vidrio doblado, que permite el paso de los insectos al frasco recolector, cuando se aspira.
- 3.2. Cernidor para separar los insectos.- Consta de un bastidor con perforaciones de 3mm. de diámetro, - que permite el paso de los insectos, evitando el paso de los granos, y de una charola de aluminio donde se reciben los insectos.
- 3.3. Caja de petri que contiene una capa de parafina.-

Esta caja se utilizó como base en la disección de insectos, y la parafina sirve como soporte para poder fijar al insecto.

3.4. Cámara húmeda.- Esta cámara se utilizó para el cultivo de los insectos. Se utilizó a 28° y 70 % de Humedad Relativa.

3.5. Microscopio de contraste de fases.-

Marca : Carl Zeiss.

Modelo : K7-A binocular.

Oculares : 10x-12.5x-y20x.

Objetivos : 10x-40x-100x, con aditamento para contraste de fases.

Con revólver cuádruple con tope interior, con lámpara compacta B de bajo voltaje para aplicación del sistema de iluminación Koehler. Con condensador 0.9z con lente rebatible z, apertura 0.9, distancia focal 13.1 mm., distancia al objeto 2.0-2.2 mm.

3.6. Microscopio de disección esteroscópico.-

Marca : STEMI IV.

Oculares : 10x-200m de 0.8 a 4 aumentos.

Objetivos : 0.8x-1.0x-1.25x-1.6x-2.25x-3.2x-4.0x y 5.0x. Con luz incidente de lámpara incandescente, modelo:L-8.

3.7. Frasco de vidrio de boca ancha.- Este frasco se utilizó en el cultivo de los insectos.

Diámetro de la boca 8.5 cm.

Diámetro del frasco 10.0 cm.

Altura del frasco 16.0 cm.

La boca se cubrió con tela Nylon No 200.

3.8. Frasco de vidrio de boca ancha.- Este tipo de frascos fueron utilizados en la evaluación de los microorganismos.

Diámetro de la boca 4.5 cm.

Diámetro del frasco 6.0 cm.

Altura del frasco 7.0 cm.

La boca se cubrió con tela Nylon No 200.

3.9. Frasco de vidrio.- Este frasco fué utilizado en la separación de los lotes de insectos, por especie y sexo.

Diámetro del frasco 1.6 cm.

Altura del frasco 6.0 cm.

La boca se cubre con algodón.

3.10. Gooch de porcelana.

3.11. Gradilla metálica para tubos.

3.12. Ligas de hule.

- 3.13. Matraces aforados de 500 y 1000 ml.
- 3.14. Matraces Erlenmeyer de 300 ml.
- 3.15. Mecheros.
- 3.16. Papel aluminio.
- 3.17. Pinceles de cerda.
- 3.18. Probetas graduadas.
- 3.19. Agujas de disección.
- 3.20. Cristalería y material en general.

REACTIVOS.

- 3.21. Agua oxigenada de 20 volúmenes.
- 3.22. Colorantes para la técnica de Gram(c-6).
- 3.23. Fucsina fenicada para la técnica de ácidos resistentes (c-6).
- 3.24. Colorantes para la tinción de cápsula:(c-6)
 - a) Fucsina fenicada.
 - b) Nigrosina saturada.
- 3.25. Colorantes para gránulos metacromáticos:(c-6)
 - a) Colorante de Albert.
 - b) Solución de lugol.
- 3.26. Colorantes para la tinción de esporas:(c-6)

a) Verde malaquita.

b) Fucsina fenicada.

3.27. Fenol al 10%.

3.28. Harina de maíz.

3.29. Harina de trigo.

3.30. Maíz en grano.

3.31. Reactivo de Erlich (c-7).

3.32. Reactivos para la prueba de la reducción de nitratos:(c-8)

a) Solución de ácido sulfanílico.

Acido acético glacial 100 cm³.

Agua 250 cm³.

Acido sulfanílico 2.8 gr .

b) Solución de dimetil-alfa-naftilamina.

Acido acético glacial 100 cm³.

Agua 250 cm³.

Dimetil-alfa-naftilamina .. 2.1 cm³.

3.33. Solución de Loche con azul de metileno al 0.005% para invertebrados.

Fórmula:

NaCl 9.0 gr.

CaCl₂ 0.25 gr.

KCl	0.42	gr.
NaHCO ₃	0.20	gr.
Glucosa	2.50	gr.
Agua destilada	1000.00	ml.

Preparación.- se debe añadir al final el CaCl₂- para evitar la formación de precipitado. El NaHCO₃ se deberá añadir después de calentada la solución, ya que de lo contrario se modificaría el pH por la eliminación de CO₂.

MEDIOS DE CULTIVO.

3.34. Medio No 1:

Fórmula:

Glucosa	4.0	gr.
Peptona	5.0	gr.
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5	gr.
CaCl ₂	0.5	gr.
EDTA	0.2	gr.
NaCl	0.5	gr.
Extracto de levadura ..	1.5	gr.
Agar	25.0	gr.

Agua destilada 1000.0 ml.

Preparación.- se disuelve el medio calentando ligerjmente, el CaCl_2 se agrega al final. Se este-riliza a 120° y 1 atm. de presión durante 15 minu-tos, ajustar el pH entre 6-8.

3.35. Medio No 2:

Fórmula:

Maltosa	1.5	gr.
Peptona	3.0	gr.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	gr.
CaCl_2	0.2	gr.
EDTA	0.1	gr.
NaCl	0.2	gr.
Agar	25.0	gr.
Extracto de carne	1.5	gr.
Agua destilada	1000.0	ml.

Preparación.- se disuelve el medio calentando ligeramente y añadiendo el CaCl_2 al final. Se pue-den usar cubos de caldo, o caldo de carne o po-llo, o sopa enlatada de pollo o res en vez del -extracto de carne. Se esteriliza el medio a 120° y 1 atm. de presión, durante 15 minutos, el pH -será entre 6-8.

3.36. Medio No 3:

Fórmula:

Bactopeptona	1.5	gr.
Extracto de levadura	5.0	gr.
MgPO ₄ .3H ₂ O	0.1	gr.
NaSO ₄	0.1	gr.
Maíz en grano	200.0	gr.
Agar	25.0	gr.
Agua destilada	1000.0	ml.

Preparación.- el maíz se pone a cocer en el agua hasta que se ablanda y se abre, después se muele y se deja reposar durante 30 minutos, y enseguida se cuela. A éste colado se le adicionan los demás nutrimentos, se disuelven con ligero calentamiento y se esteriliza a 120°C y 15 libras de presión durante 20 minutos.

3.37. Medios para bioquímicas.

3.38. Medios selectivos:

- a) Medio 110 DIFCO.
- b) Medio de gelosa sangre.

3.39. Otros medios:

- a) Agar inclinado.
- b) Gelatina.

4.- METODOS.

4.1. OBTENCION DE LOS INSECTOS.

El presente trabajo es un estudio sobre la Microbiología de los insectos Sitophilus oryzae (gorgojo del arroz) y Sitophilus granarius (gorgojo de los granos).

Los granos infestados por dichos insectos, fueron recolectados en el campo en varios Estados de la República Mexicana (Jalisco, Guerrero, Oaxaca, Guanajuato Morelos, Puebla, Edo. de México, Veracruz y Tamaulipas .) (§) y cultivos puros de éstas dos especies fueron proporcionados por el Dr. Raúl MacGregor, investigador del Instituto de Biología de la Universidad Nacional-Autónoma de México.

(§) Los granos recolectados se utilizarón para un estudio colateral de insectos plaga de los granos almacenados. Este estudio fue llevado a cabo en el Departamento de Zoología del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

4.2. CULTIVO Y MANEJO DE LOS INSECTOS.

Los insectos utilizados en el presente trabajo fueron:

a) Sitophilus oryzae

Orden: Coleópteros.

Familia: Curculiónidos.

Especie: *Sitophilus oryzae*.

Nombre vulgar: Gorgojo del arroz.

b) Sitophilus granarius

Orden: Coleópteros.

Familia: Curculiónidos.

Especie: *Sitophilus granarius*.

Nombre vulgar: Gorgojo de los granos.

Los insectos fueron separados del grano de la siguiente manera: sobre el cernidor (3.2.) se puso una cierta cantidad de granos infestados de insectos; se agitó manualmente. El cernidor permitió la caída de insectos sobre la charola del fondo, sin causarles el menor daño, quedando separados del grano, el cual quedó en la parte superior del cernidor.

Posteriormente los insectos fueron separados por -

especie, teniendo en cuenta las siguientes características:

a) *S.oryzae*

Longitud del adulto: de 2.5 a 4.5 mm.

Alas posteriores: presentes.

Hoyuelos del protórax: redondos.

Elitros: presentan cuatro manchas rojizas.

b) *S.granarius*

Longitud del adulto: de 3.0 a 4.0 mm.

Alas posteriores: ausentes.

Hoyuelos del protórax: son de forma ovalada.

Elitros: no presentan manchas.

La separación se hizo de la siguiente manera: con un pincel (3.17.) humedecido (en agua destilada) se tomaron los insectos de la charola y se colocaron en una caja petri (3.3.) la cual tenia una capa de parafina. Utilizando el microscopio de disección y por observación de las características antes mencionadas, se separaron en dos grupos, manejandose por medio del pincel húmedo; ya separados los insectos por especies se colocaron en diferentes frascos (3.7.); a los cuales se les añadió maíz y harina de maíz como alimento,

previamente tratados(*).

Los cultivos se guardarón en la cámara húmeda a 28° y con una Humedad Relativa del 70%.

(*) El maíz utilizado fué tratado de la siguiente manera: en primer lugar, el maíz fué lavado con abundante-agua destilada, enseguida se dejó secar a temperatura-ambiente. Ya seco se colocó en un frasco y se guardó - en congelación a 4°C durante ocho días.

La congelación tiene por objeto eliminar cualquier-tipo de huevecillos presentes en los granos.

De éstos cultivos, por medio de un aspersor de va--cío (3.1.) se fueron separando los insectos de uno en-uno hasta completar lotes de 100 individuos, que fueron colocados en frascos (3.9.) con tapón de algodón.

Estos fueron posteriormente utilizados en el aisla-miento de los microorganismos.

Los cultivos puros de estos insectos que nos fueron proporcionados, se utilizaron en la evaluación de los-microorganismos aislados. Sin embargo, para su uso los insectos tuvieron que ser sexados, tomando en cuenta - las siguientes características; en ambas especies:

Sexo femenino:

Rostro: es más largo y cilíndrico.

Puntuaciones: son esparcidas, superficiales y rara vez se encuentran en posición distal.

Cola: recta.

Sexo masculino:

Rostro: es más ancho, corto y menos curvado; visto de manera dorsal es ligeramente angosto en el centro y ancho en la parte distal.

Puntuaciones: se encuentran muy juntas y fuertemente marcadas.

Cola: esta flexionada hacia el abdomen.

Para observar las características anteriores, el manejo de los insectos se hizo sobre una caja de petri con capa de parafina, utilizando el microscopio de disección.

Se formaron los siguientes lotes:

- a) Lotes de *S.oryzae*, sexo femenino.
- b) Lotes de *S.granarius*, sexo femenino.
- c) Lotes de *S.oryzae*, sexo masculino.
- d) Lotes de *S.granarius*, sexo masculino.

4.3. LOCALIZACION DE LOS MICROORGANISMOS.

La localización de los microorganismos, se hizo utilizando los insectos que fueron obtenidos de los granos recolectados en el campo, buscando la presencia en ellos, de micetomas simbiotes o patógenos(8.15). Para poder comprobar lo anterior, se hicieron disecciones de la siguiente manera:

- 1.- Con un pincel humedecido en agua destilada, se tomó un insecto al azar, colocándolo sobre la placa de parafina y usando el microscopio de disección se le determinó la especie y sexo.
- 2.- El insecto fué adormecido ligeramente con alcohol del 96%, y fijado de las alas a la placa, con alfileres.
- 3.- Con un bisturí le fué cortada la cabeza transversalmente.
- 4.- Se insertó una aguja de disección en el orificio del cuello y se dividió al insecto longitudinalmente, a continuación se levantó y quitó el protórax.
- 5.- De esta manera quedaron al descubierto los órganos

internos, pudiendose separar el intestino medio del insecto.

- 6.- Con una aguja de disección, se aisló el intestino-medio y se colocó sobre un portaobjetos, esta operación se efectuó con cuidado.
- 7.- El tejido aislado fué teñido durante 10 minutos con una gota de la solución de Loche (3.33.) adicionada de 0.005% de azul de metileno; de ahí se transfirió a un portaobjetos que contenía una gota de solución de Loche sin teñir.
- 8.- El tejido, en estas circunstancias fué observado usando un campo claro en el microscopio de contraste de fases.
- 9.- La preparación fué aplastada ligeramente con un cubreobjetos, secandóse la solución de Loche con papel filtro y aplicando una ligera presión sobre el cubreobjetos con una aguja de disección hasta la ruptura del tejido.
- 10.-El colorante tiñe los microorganismos que se encuentran en los micetomas, y de esta manera son fácilmente observados utilizando el microscopio de contraste de fases.

El método anteriormente descrito fué diseñado y sugerido por el Dr. Raúl MacGregor, Investigador del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

4.4. AISLAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS.

Se realizaron varios aislamientos utilizandose en cada uno de ellos lotes de 100 insectos (4.2), de las especies S.oryzae y S.granarius.

Pasos seguidos en el aislamiento:

- 1.- Se puso un lote de insectos dentro de un vaso de precipitado de 80 ml. Se le agregó 40 ml. de agua destilada estéril, con la cual fueron lavados los insectos con la ayuda de un pincel durante un minuto. El objeto de éste lavado fué para eliminar restos de harina y maíz.
- 2.- Se pasaron los insectos a un segundo vaso de precipitado que contenía 30 ml. de agua oxigenada (3.21) Se dejaron ahí por espacio de 2 minutos. El agua oxigenada se usó como desinfectante débil.
- 3.- De ahí se pasaron a un tercer vaso de precipitado-

que contenía 30 ml. de fenol (3.27.) durante 2 minutos. El fenol se usó como desinfectante fuerte.

4.- Se colocó un embudo Büchner de porcelana sobre un vaso de precipitado, dentro del Büchner fueron depositados los insectos y se lavaron con agua destilada estéril para eliminar los restos de los desinfectantes.

Los desinfectantes se usaron con el objeto de eliminar todo tipo de microorganismos presentes en la superficie del insecto.

5.- Sobre un vidrio de reloj se puso un filtro gooch de porcelana estéril; los insectos ya lavados se introdujeron en el gooch y se maceraron con una varilla de vidrio. El gooch tiene la función de filtro para la retención de partículas gruesas y obtener así un macerado uniforme.

6.- Utilizando los medios de cultivo No 1,2 y 3 se prepararon 25 cajas petri por cada uno de ellos.

7.- Se sembraron las cajas tomando muestras con el asa del macerado.

8.- Las cajas ya sembradas se incubaron a diferentes temperaturas:

- a) Diez cajas de cada medio se incubaron a 37°C durante 48 hrs., para observar crecimiento de bacterias.
- b) Diez cajas de cada medio se incubaron a 28°C durante 72 hrs., para observar crecimiento de hongos.
- c) Cinco cajas de cada medio se incubaron a 30°C durante 8 días, para observar cualquier otro tipo de crecimiento.

Pasado el tiempo de incubación se sacaron las cajas de las diferentes estufas y se procedió al aislamiento de las colonias que habían crecido.

Para el aislamiento de las colonias se prepararon tubos con el medio No 1 en forma inclinada. Se escogió este medio por ser el que dió mejores resultados en el crecimiento de todas las colonias.

Con el asa se tomaron muestras de las colonias por aislar, y con la técnica usual se sembraron en los tubos con los medios inclinados, para ir obteniendo por separado los diferentes cultivos de las diversas colonias de microorganismos, observadas.

Los tubos se incubaron a 28°C, por ser esta la temperatura óptima de crecimiento de los insectos. Ya crecidas las colonias fueron guardadas a 6°C para su conservación.

Para clasificar a las cepas aisladas se tomaron en cuenta sus caracteres morfológicos, sus características de cultivo y sus actividades fisiológicas.

4.5. CLASIFICACION DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS.

Para la clasificación de éstos se siguió el siguiente programa:(8.3.)

1.- Características de cultivo:

a) Apariencia macroscópica: forma, tamaño y bordes.

b) Superficie: topografía, elevación y consistencia.

c) Caracteres ópticos: color y brillo.

2.- Apariencia microscópica:

a) Tinción de Gram.

b) Tinción de ácidos resistentes, granulos y cápsula.

c) Características morfológicas: movilidad, flagelos y esporas.

3.- Crecimiento:

a) Se sembró en agar inclinado y se observó el -

crecimiento por intervalos de 24 horas para ver -
temperatura óptima.

b) Se sembró en gelatina, observandose la presen-
cia, clase y tipo de licuefacción, sedimentación,
turbidez y color.

4.- Reacción al pH (óptimo).

5.- Relación al oxígeno libre: aerobio, facultativo y
anaerobio.

6.- Pruebas de fermentación:

a) Monosacáridos: glucosa.

b) Disacáridos: lactosa y sacarosa.

c) Polisacáridos: almidón.

d) Alcohol: manitol.

e) Producción de indol.

f) Leche tornasolada: reacción.

g) Producción de gas.

7.- Acción sobre los nitratos.

8.- Pruebas adicionales:

a) Azul de metileno: reacción.

b) Rosa anilina: reacción.

9.- Patogenicidad:

a) Hemólisis en gelosa sangre.

- b) Prueba de la coagulasa.
- c) Reacción del telurito.
- d) Producción de pigmento (en medio 110 DIFCO).

4.6. EVALUACION DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS PARA SU USO EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE LOS INSECTOS.

Para poder evaluar las cepas microbianas, aisladas se prepararon cultivos en medio líquido (3.34.). En matraces Erlenmeyer de 300 ml. se pusieron 150 ml. del medio No 1, se esterilizó y se incubó a 28°C durante 48 horas como prueba de esterilidad. Pasada esta prueba, los medios fueron inoculados con las cepas a probar.

Los matraces fueron puestos en agitación a 28°C durante 48 horas, con el objeto de obtener crecimientos concentrados. Pasado este tiempo de incubación, las cepas estuvieron listas para su uso.

Los frascos (3.8.) utilizados en el experimento fueron lavados y secados; se etiquetaron en el siguiente orden:

- 1.- Número del frasco.

- 2.- Número de la cepa del microorganismo.
- 3.- Especie de Sitophilus.
- 4.- Número de insectos puestos en el frasco, (hembras y machos).
- 5.- Tiempo de duración de las pruebas, por cada cepa:
 - a) Prueba No 1.- 62 días.
 - b) Prueba No 2.- 70 días.
 - c) Prueba No 3.-130 días.

A cada frasco se le añadieron diez granos de maíz-tratado (4.2.*), inmediatamente después se adicionaron 15 ml. de la suspensión de la cepa correspondiente, mezclando por espacio de 5 minutos, para que la suspensión quedara impregnada en el grano; pasado este tiempo se le fué añadiendo poco a poco harina de maíz revolviendo la cepa con los granos y la harina. La adición de harina tiene por objeto absorber el agua del medio y permitir así, mejores condiciones de vida para el insecto.

Por otra parte, los insectos separados por especie y sexo, fueron sumergidos durante 2 minutos en parte de la suspensión de la cepa correspondiente al frasco donde posteriormente fueron colocados en un número i-

gual de hembras y machos:

- a) Prueba No 1.- 5 hembras, 5 machos. Total: 10 insec
tos.
- b) Prueba No 2.- 7 hembras, 7 machos. Total: 14 insec
tos.
- c) Prueba No 3.- 5 hembras, 5 machos. Total: 10 insec
tos.

Todas las cepas y el control se trabajaron de la misma manera; sólo que en el control se utilizó agua destilada estéril, en igual volumen, en lugar de la suspensión. El uso del agua destilada estéril tiene por objeto mantener las mismas condiciones de humedad tanto en el control como en los problemas.

Ya listos los frascos, fueron tapados con la tela Nylon (3.8.) que fué sujeta al frasco con una liga. Los frascos fueron colocados en la cámara húmeda a 28° C y 70% de Húmedad Relativa (H.R.), permaneciendo ahí durante 32 días. Transcurrido este tiempo se observó el crecimiento de la primera generación filial (F_1), fueron eliminados de los frascos los insectos adultos inicialmente puestos, los frascos conteniendo solamente a F_1 se volvieron a guardar bajo las mismas condi-

ciones anteriores de temperatura y humedad. A los 62- y 70 días (5.4.) contando a partir del primer día en que se inició el experimento se observó el crecimiento de la segunda generación filial (F_2).

Los frascos fueron vaciados uno por uno sobre una charola y se examinó su contenido cuidadosamente. Los insectos adultos correspondían a F_1 , y los insectos jóvenes y larvas correspondían a F_2 .

A cada grano de maíz puesto en el frasco se le observó:

- a) El ataque del insecto hacia el maíz.
- b) El número de larvas e insectos jóvenes que se encontraban dentro del grano.

Para determinar la siguiente generación F_3 , todos los pasos anteriores fueron seguidos, con las siguientes modificaciones:

- a) A los 65 días se retiraron del frasco los insectos pertenecientes a F_1 .
- b) A los 130 días se hizo el recuento de F_2 y F_3 de la misma manera como se hizo anteriormente con F_1 y F_2 .

Todos los datos obtenidos en las pruebas anteriores

fueron anotados para su posterior evaluación.

En el capítulo de resultados podemos observar las gráficas y tablas de datos concernientes a los resultados de este trabajo.

5.- RESULTADOS.

5.1. PRESENCIA DE MICROORGANISMOS Y MICETOMAS.

Siguiendo la metodología (4.3.) se hicieron las siguientes observaciones:

- 1.- Se encontraron microorganismos en ambas especies de gorgojos.
- 2.- En cada especie los microorganismos fueron encontrados en el intestino medio, en los organos reproductores de las hembras adultas y en los micetomas de las larvas.
- 3.- Los microorganismos nunca fueron identificados positivamente en los organos reproductores machos, de ambas especies.
- 4.- Los microorganismos aparecieron en números tan grandes que es imposible que fueran invasores casuales, y su aparición en micetomas confirma esto.
- 5.- Los microorganismos fueron encontrados mas frecuentemente en las muestras del intestino medio de Sitophilus oryzae que en Sitophilus granarius.

Los resultados de las disecciones hechas en ambas-



especies confirman lo anterior.

S.oryzae:

De un lote de 50 individuos, 37 fueron hembras y 13 machos. En ninguno de los machos se observó la presencia de microorganismos; de las 37 hembras 31 de ellas los tuvieron, lo que representa un 83.78%.

En las 25 larvas examinadas se obtuvieron resultados positivos, de la presencia de micetomas, en el 100% de ellas.

S.granarius:

De un lote de 50 individuos, 24 fueron hembras y 26 machos. En ninguno de los machos se observó la presencia de microorganismos; de las 24 hembras 16 de ellas los tuvieron, lo que representa un 66%.

En las 25 larvas examinadas se obtuvieron resultados positivos, de la presencia de micetomas, en el 100% de ellas.

5.2. MICROORGANISMOS OBTENIDOS.

De los aislamientos que se realizaron (4.4.), se --
obtuvieron las 16 cepas siguientes:

- Cepa No 1.- Levaduras.
- Cepa No 2.- Cocos (racimos).
- Cepa No 3.- Cocos (racimos y tetradas).
- Cepa No 4.- Levaduras.
- Cepa No 5.- Bacilos.
- Cepa No 6.- Cocos (racimos).
- Cepa No 7.- Cocos (cadenas).
- Cepa No 8.- Cocos (racimos).
- Cepa No 9.- Cocobacilos.
- Cepa No 10.- Cocos (racimos).
- Cepa No 11.- Levaduras.
- Cepa No 12.- Bacilos.
- Cepa No 13.- Cocos (racimos y tetradas).
- Cepa No 14.- Cocos (racimos).
- Cepa No 15.- Cocos (racimos).
- Cepa No 16.- Cocobacilos.

Mediante estudios macroscópicos, microscópicos y bioquímicos de cada cepa, se comprobó que solamente ocho de ellas, eran diferentes, siendo el resto, repeticiones de las anteriores, por lo que se eliminaron estas últimas.

De cada grupo de cultivos similares, se eligió una de ellas en la forma siguiente:

Cepa No 1

Cepa No 4 = Cepa No 1

Cepa No 11

Cepa No 2

Cepa No 8 = Cepa No 8

Cepa No 14

Cepa No 3

= Cepa No 13

Cepa No 13

Cepa No 5

= Cepa No 5

Cepa No 6

Cepa No 10

= Cepa No 10

Cepa No 15

Cepa No 7 = Cepa No 7

Cepa No 9
Cepa No 16 = Cepa No 9

Cepa No 12 = Cepa No 12

Las cepas se trabajaron siguiendo esta numeración.

5.3. CLASIFICACION DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS.

Cuadro No 1.- Estudio de la forma de las colonias desarrolladas en los medios No 1,2 y 3.

Cepa No	Forma	Elevación	Superficie
1	irregular	plana	lisa
5	circular	plana	lisa
7	irregular	plana	aspera
8	circular	convexa	lisa
9	irregular	convexa	estriada
10	circular	convexa	lisa
12	filamentosa	convexa	rugosa
13	circular	convexa	lisa

Metodología utilizada (4.5.).

Cuadro No 2.- Estudio de la forma de las colonias desarrolladas en los medios No 1, 2 y 3.

Cepa No	Bordes	Caracteres Opticos	Consistencia
1	irregulares	brillosa	cremosa
5	ondulados	opaca	cremosa
7	lobulados	brillosa	viscosa
8	continuos	brillosa	cremosa
9	irregulares	obscura	quebradiza
10	continuos	opaca	cremosa
12	filamentosos	opaca	quebradiza
13	continuos	opaca	cremosa

Metodología utilizada (4.5.).

Cuadro No 3.- Apariencia macroscópica y microscópica --
de las colonias crecidas en los medios
de cultivo No 1, 2 y 3.

Cepa No	Color de la colonia	Apariencia microscópica
1	crema	células ovales, a veces redondas, que presentan gemación.
5	amarilla	bacilos pequeños
7	amarilla	cadenas de cocos
8	gris	racimos de cocos
9	gris	cocobacilos
10	gris	racimos de cocos
12	amarilla	bacilos pequeños
13	blanca	tetradas y racimos de - cocos, a veces sueltos- y otros unidos.

Metodología utilizada (4.5.).

Cuadro No 4.- Pruebas en el medio de gelatina.

Cepa No	Licuefacción	Sedimentación	Turbidez
1	-	-	-
5	+	+	+
7	+	-	+
8	+	+	-
9	+	-	+
10	+	+	-
12	-	-	-
13	+	-	-

Metodología utilizada (4.5.).

Cuadro No 5.- Resultados de las reacciones al pH óptimo de los microorganismos; la relación al oxígeno libre, y la movilidad del microorganismo.

Cepa No	Movilidad del microorganismo	pH	Relación al oxígeno libre
1	-	3.6	facultativo
5	+	6.5	anaerobio
7	-	7.5	facultativo
8	-	6.8	facultativo
9	-	7.4	facultativo
10	-	6.8	facultativo
12	+	6.6	anaerobio
13	-	7.2	aerobio

Metodología utilizada (4.5.).

Cuadro No 6.- Resultado de las tinciones efectuadas.

Cepa No	Gram	Granulos metacromáticos	Esporas	Cápsula	Acido resistencia
1	+	-	+	-	-
8	+	-	-	-	-
9	+	+	-	-	-
10	+	-	-	-	-
13	+	-	-	-	+

Cuadro No 7.- Resultados de las reacciones de fermentación, efectuadas en las cepas seleccionadas.

Cepa No	Glucosa	Lactosa	Sacarosa	Almidón	Manitol	Indol	Gas
1	+	-	+	-	-	-	+
8	+	+	+	-	+	-	-
9	+	+	+	-	+	+	+
10	+	+	+	+	+	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro No 8.- Resultados de pruebas adicionales.

Cepa No	Leche tornasol	Azul de metileno	Rosa anilina	Reducción de NO ₃ a NO ₂
1	+	-	-	-
8	+	+	+	+
9	+	-	-	+
10	+	+	+	+
13	+	+	+	+

Cuadro No 9.- Resultados de las pruebas efectuadas para saber la patogenicidad de las cepas seleccionadas.

Cepa No	Coagulasa	Hemólisis en Telurito	Producción de pigmento en 110
1	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
13	-	-	-

Tabla No 1. Prueba No 1 (a) (4.6.)

Especie *S.oryzae*.

Cepa No 1:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
1	5	5	8	1.6	3	0.6	62	60
2	5	5	11	2.2	5	1.0	62	40
3	5	5	7	1.4	2	0.4	62	25
4	5	5	10	2.0	6	1.2	62	75
Promedios:				1.8		0.8		50

Cepa No 8:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
5	5	5	0	0.0	0	0.0	62	10
6	5	5	2	0.4	0	0.0	62	10
7	5	5	11	2.2	1	0.2	62	30
8	5	5	6	1.2	0	0.0	62	15
Promedios:				0.95		0.05		16.25

Cepa No 9:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
9	5	5	18	3.6	9	1.8	62	50
10	5	5	12	2.4	10	2.0	62	60
11	5	5	16	3.2	14	2.8	62	40
12	5	5	10	4.0	18	3.6	62	80
Promedios:				3.3		2.5		57

Cepa No 10:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
13	5	5	3	0.6	0	0.0	62	20
14	5	5	3	0.6	1	0.2	62	10
15	5	5	4	0.8	0	0.0	62	15
16	5	5	6	1.2	2	0.4	62	20
Promedios				0.8		0.15		16.25

Cepa No 13:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
17	5	5	5	1.0	4	0.8	62	30
18	5	5	5	1.0	6	1.2	62	30
19	5	5	4	0.8	2	0.4	62	20
20	5	5	7	1.4	3	0.6	62	25
Promedios				1.05		0.75		26.25

Control:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
21	5	5	10	2.0	7	1.4	62	40
22	5	5	8	1.6	6	1.2	62	40
23	5	5	12	2.4	10	2.0	62	30
24	5	5	10	2.0	9	1.8	62	60
Promedios:				2.0		1.6		42.5

Tabla No 2. Prueba No 1 (a) (4.6.)

Especie *S.granarius*.

Cepa No 1:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
25	5	5	12	2.4	8	1.6	62	90
26	5	5	18	3.6	10	2.0	62	85
27	5	5	15	3.0	7	1.4	62	70
28	5	5	17	3.4	9	1.8	62	100
Promedios:				3.1		1.7		86.25

Cepa No 8:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
29	5	5	3	0.6	2	0.4	62	15
30	5	5	8	1.6	4	0.8	62	35
31	5	5	6	0.2	1	0.2	62	20
32	5	5	9	1.8	3	0.6	62	25
Promedios				1.3		0.5		23.75

Cepa No 9:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
33	5	5	9	1.8	6	1.2	62	30
34	5	5	11	2.2	8	1.6	62	25
35	5	5	13	2.6	12	2.4	62	55
36	5	5	10	2.0	4	0.8	62	45
Promedios:				2.15		1.5		38.75

Cepa No 10:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
37	5	5	5	1.0	1	0.2	62	15
38	5	5	6	1.2	2	0.4	62	20
39	5	5	8	1.6	4	0.8	62	30
40	5	5	10	2.0	3	0.6	62	40
Promedios:				1.45		0.5		26.25

Cepa No 13:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
41	5	5	8	1.6	6	1.2	62	35
42	5	5	6	1.2	3	0.6	62	40
43	5	5	10	2.0	5	1.0	62	50
44	5	5	9	1.8	7	1.4	62	30
Promedios:				1.65		1.05		30.75

Control:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
45	5	5	10	2.0	7	1.4	62	50
46	5	5	10	2.0	8	1.6	62	70
47	5	5	11	2.2	10	2.0	62	40
48	5	5	12	2.4	11	2.2	62	40
Promedios:				2.15		1.8		50

Tabla No 3. Prueba No 2 (b) (4.6.)

Especie *S.oryzae*.

Cepa No 5:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
49	7	7	10	1.4	8	1.0	70	30
50	7	7	12	1.7	6	0.8	70	40
51	7	7	11	1.5	6	0.8	70	30
Promedios				1.5		0.9		33.3

Cepa No 7:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
52	7	7	25	3.5	12	1.7	70	40
53	7	7	18	2.5	8	1.1	70	35
54	7	7	20	2.8	10	1.4	70	50
Promedios:				2.9		1.4		41.6

Tabla No 5. Prueba No 2 (b) (4.6.)

Especie *S.oryzae*.

Cepa No 5:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
49	7	7	10	1.4	8	1.0	70	30
50	7	7	12	1.7	6	0.8	70	40
51	7	7	11	1.5	6	0.8	70	30
Promedios				1.5		0.9		33.3

Cepa No 7:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
52	7	7	25	3.5	12	1.7	70	40
53	7	7	18	2.5	8	1.1	70	35
54	7	7	20	2.8	10	1.4	70	50
Promedios:				2.9		1.4		41.6

Cepa No 12:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
55	7	7	20	2.8	14	2.0	70	40
56	7	7	15	2.1	12	1.7	70	35
57	7	7	19	2.7	16	2.2	70	40
Promedios:				2.5		1.9		38.5

Cepas No 8+10:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
58	7	7	15	2.1	6	0.8	70	30
59	7	7	18	2.5	3	0.4	70	40
60	7	7	12	1.7	4	0.5	70	20
Promedios:				2.1		0.5		30

Cepas No 9+1:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
61	7	7	35	5.0	20	2.8	70	60
62	7	7	28	4.0	19	2.7	70	50
63	7	7	32	4.5	22	3.1	70	60
PROMEDIOS:				4.5		2.8		56.6

Control:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
64	7	7	20	2.8	16	2.2	70	50
65	7	7	18	2.5	12	1.7	70	40
66	7	7	22	3.1	14	2.0	70	60
Promedios:				2.8		1.9		50

Tabla No 4. Prueba No 2 (b) (4.6.)

Especie *S.granarius*.

Cepa No 5:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
67	7	7	9	1.2	4	0.5	70	30
68	7	7	14	2.0	9	1.2	70	45
69	7	7	7	1.0	5	0.7	70	30
Promedios:				1.4		0.8		35

Cepa No 7:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
70	7	7	21	3.0	11	1.5	70	40
71	7	7	17	2.4	9	1.2	70	30
72	7	7	23	3.2	15	2.1	70	40
Promedios:				2.8		1.6		36.6

Cepa No 12:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
73	7	7	22	3.1	12	1.7	70	50
74	7	7	17	2.4	10	1.4	70	40
75	7	7	20	2.8	16	2.2	70	45
Promedios:				2.7		1.7		45

Cepas No 8+10:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
76	7	7	20	2.8	7	1.0	70	50
77	7	7	17	2.4	3	0.4	70	30
78	7	7	19	2.7	5	0.7	70	15
Promedios:				2.6		0.7		31.6

Cepas No 9+1:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
79	7	7	30	4.2	24	3.4	70	70
80	7	7	25	3.5	18	2.5	70	50
81	7	7	29	4.1	17	2.4	70	60
Promedios:				3.9		2.7		60

Control:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	T	%
82	7	7	24	3.4	18	2.5	70	40
83	7	7	26	3.7	19	2.7	70	60
84	7	7	19	2.7	13	1.8	70	50
Promedios:				3.2		2.3		50

Tabla No 5. Prueba No 3 (c) (4.6.).

Especie *S.oryzae*.

Cepa No 1:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	F ₃	F ₃ /H	T	%
85	5	5	7	1.4	5	1.0	8	1.6	130	80
86	5	5	10	2.0	6	1.2	10	2.0	130	90
87	5	5	9	1.8	3	0.6	7	1.4	130	70
<u>Promedios:</u>				1.7		0.9		1.6		80

Cepa No 5:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	F ₃	F ₃ /H	T	%
88	5	5	10	2.0	6	1.2	6	1.2	130	80
89	5	5	8	1.6	7	1.4	10	2.0	130	90
90	5	5	8	1.6	5	1.0	8	1.6	130	70
<u>Promedios:</u>				1.7		1.2		1.6		80

Cepa No 7:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	F ₃	F ₃ /H	T	%
91	5	5	12	2.4	8	1.6	9	1.8	130	80
92	5	5	10	2.0	7	1.4	8	1.6	130	75
93	5	5	10	2.0	7	1.4	10	2.0	130	70
Promedios:				2.1		1.4		1.8		75

Cepa No 8:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	F ₃	F ₃ /H	T	%
94	5	5	3	0.6	0	0.0	0	0.0	130	20
95	5	5	6	1.2	4	0.8	1	0.2	130	20
96	5	5	7	1.4	3	0.6	2	0.4	130	30
Promedios:				1.0		0.4		0.2		23

Cepa No 9:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	F ₃	F ₃ /H	T	%
97	5	5	19	3.8	14	2.8	22	4.4	130	100
98	5	5	20	4.0	16	3.2	25	5.0	130	95
99	5	5	16	3.2	10	2.0	15	3.0	130	80
Promedios:				3.6		2.6		4.1		91

Cepa No 10:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	F ₃	F ₃ /H	T	%
100	5	5	6	1.2	4	0.8	2	0.4	130	30
101	5	5	10	2.0	7	1.4	5	1.0	130	40
102	5	5	8	1.6	3	0.6	1	0.2	130	25
Promedios:				1.6		0.9		0.5		31

Cepa No 12:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	F ₃	F ₃ /H	T	%
103	5	5	18	3.6	7	1.4	8	1.6	130	80
104	5	5	13	2.6	9	1.8	10	2.0	130	70
105	5	5	16	3.2	12	2.4	7	1.4	130	75
Promedios:				3.1		1.8		1.6		75

Cepa No 13:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	F ₃	F ₃ /H	T	%
106	5	5	8	1.6	5	1.0	6	1.2	130	60
107	5	5	6	1.2	3	0.6	4	0.8	130	50
108	5	5	4	0.8	2	0.4	4	0.8	130	35
Promedios:				1.2		0.6		0.9		48

Control:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	F ₃	F ₃ /H	T	%
109	5	5	10	2.0	8	1.6	10	2.0	130	80
110	5	5	14	1.8	9	1.8	14	2.8	130	80
111	5	5	12	1.4	10	2.0	13	2.6	130	90
Promedios:				1.7		1.8		2.4		83

Tabla No 6. Prueba No 3 (c) (4.6.).

Especie *S.granarius*.

Cepa No 1:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	F ₃	F ₃ /H	T	%
112	5	5	13	2.6	9	1.8	12	2.4	130	90
113	5	5	14	2.8	10	2.0	18	3.6	130	100
114	5	5	16	3.2	11	2.2	20	4.0	130	100
Promedios:				2.8		2.0		3.3		96

Cepa No 5:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	F ₃	F ₃ /H	T	%
115	5	5	9	1.8	7	1.4	9	1.8	130	90
116	5	5	7	1.4	5	1.0	10	2.0	130	100
117	5	5	10	2.0	8	1.6	10	2.0	130	90
Promedios:				1.7		1.3		1.9		93

Cepa No 7:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	F ₃	F ₃ /H	T	%
118	5	5	11	2.2	8	1.6	10	2.0	130	80
119	5	5	10	2.0	6	1.2	10	2.0	130	60
120	5	5	12	2.4	9	1.8	12	2.4	130	75
Promedios:				2.2		1.5		2.1		71

Cepa No 8:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	F ₃	F ₃ /H	T	%
121	5	5	6	1.2	2	0.4	2	0.4	130	40
122	5	5	8	1.6	5	1.0	2	0.4	130	35
123	5	5	9	1.8	3	0.6	1	0.2	130	30
Promedios:				1.5		0.6		0.3		35

Cepa No 9:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	F ₃	F ₃ /H	T	%
124	5	5	18	3.6	9	1.8	10	2.0	130	80
125	5	5	14	2.8	8	1.6	11	2.2	130	65
126	5	5	10	2.0	7	1.4	9	1.8	130	75
Promedios:				2.8		1.6		2.0		73

Cepa No 10:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	F ₃	F ₃ /H	T	%
127	5	5	4	0.8	2	0.4	1	0.2	130	25
128	5	5	2	0.4	0	0.0	0	0.0	130	10
129	5	5	5	1.0	4	0.8	2	0.4	130	30
Promedios:				0.7		0.4		0.2		21

Cepa No 12:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	F ₃	F ₃ /H	T	%
130	5	5	20	4.0	10	2.0	11	2.2	130	80
131	5	5	15	3.0	8	1.6	6	1.2	130	60
132	5	5	18	3.6	9	1.8	10	2.0	130	85
Promedios:				3.5		1.9		1.8		73

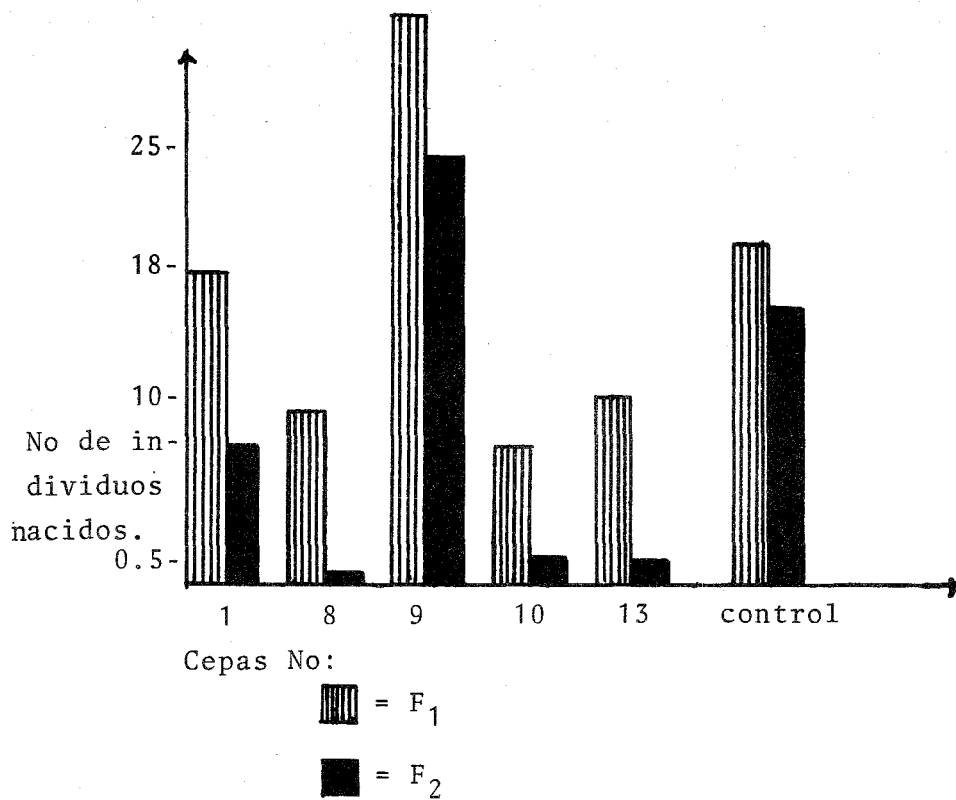
Cepa No 13:

No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	F ₃	F ₃ /H	T	%
133	5	5	8	1.6	5	1.0	6	1.2	130	60
134	5	5	6	1.2	3	0.6	4	0.8	130	50
135	5	5	4	0.8	2	0.4	4	0.8	130	35
Promedios:				1.2		0.6		0.9		48

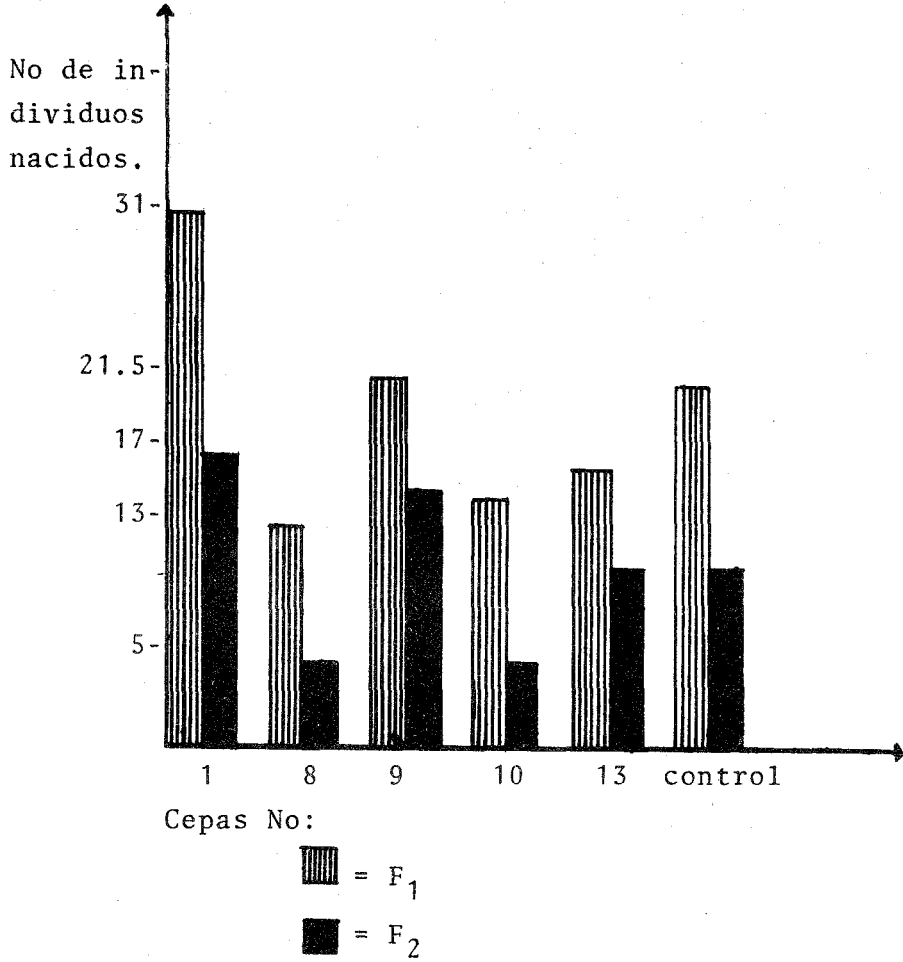
Control:

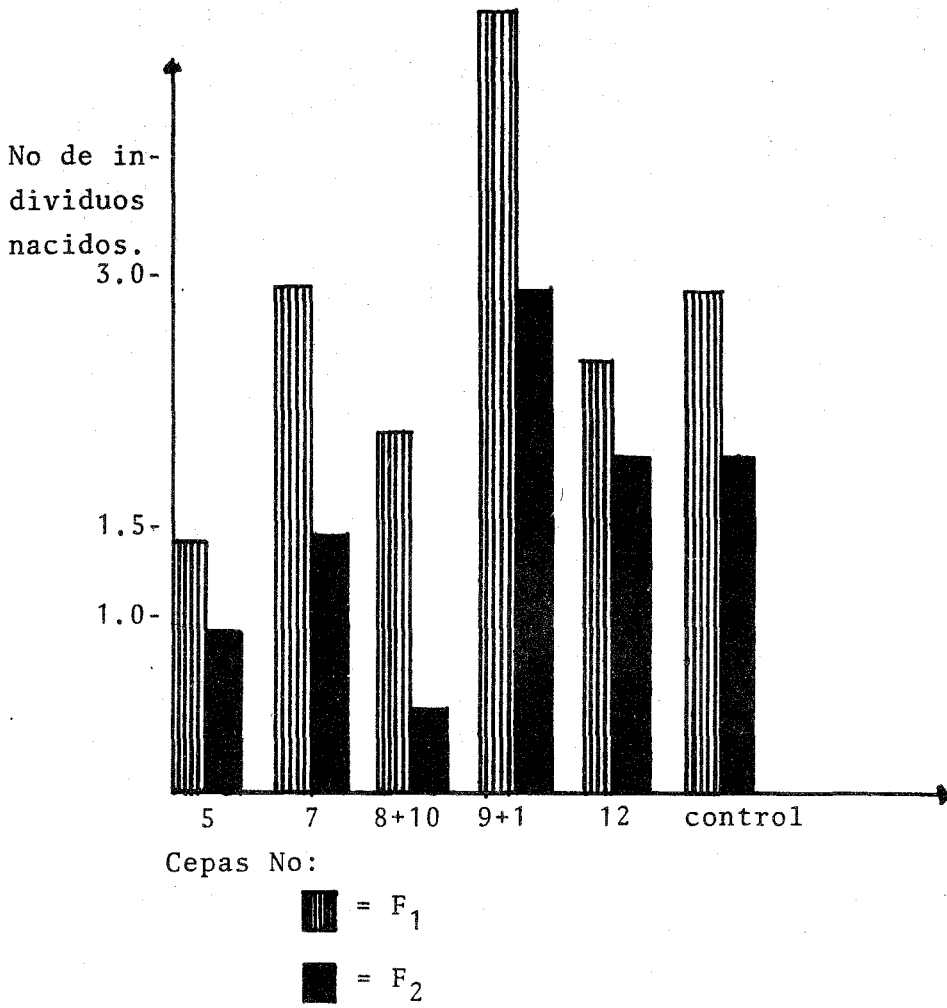
No	H	M	F ₁	F ₁ /H	F ₂	F ₂ /H	F ₃	F ₃ /H	T	%
136	5	5	12	2.4	10	2.0	13	2.6	150	80
137	5	5	15	3.0	12	2.4	16	3.2	130	90
138	5	5	11	2.2	10	2.0	12	2.4	130	75
Promedios:				2.5		2.1		2.7		81

Gráfica de los datos de la tabla No 1.



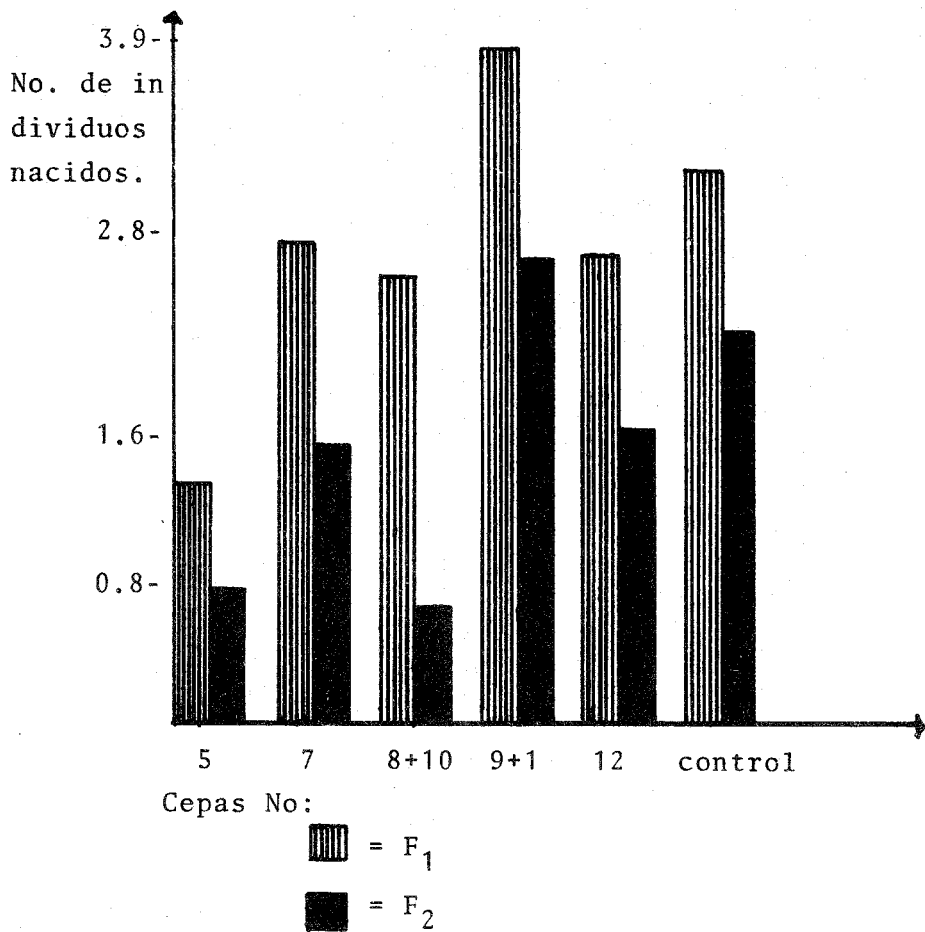
Gráfica de los datos de la tabla No 2.



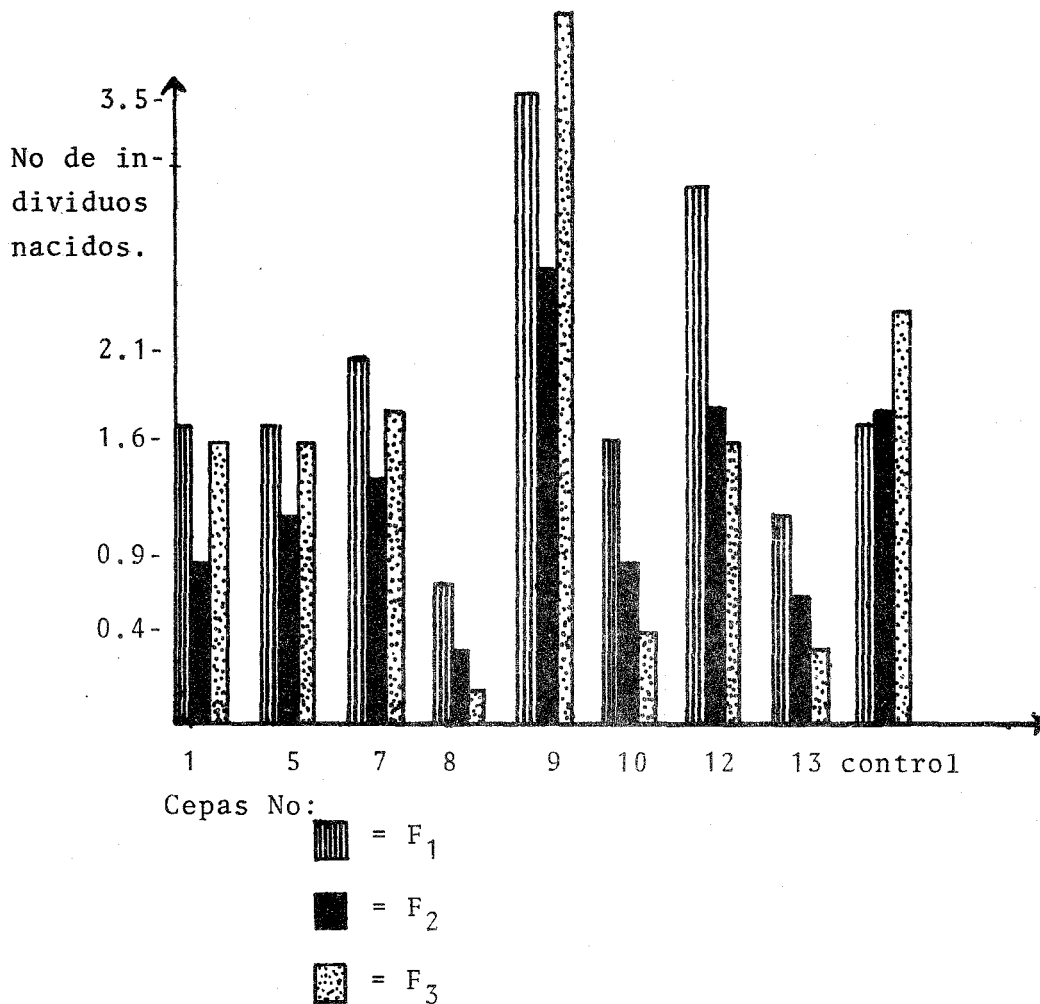


Gráfica de los datos de la tabla No 3.

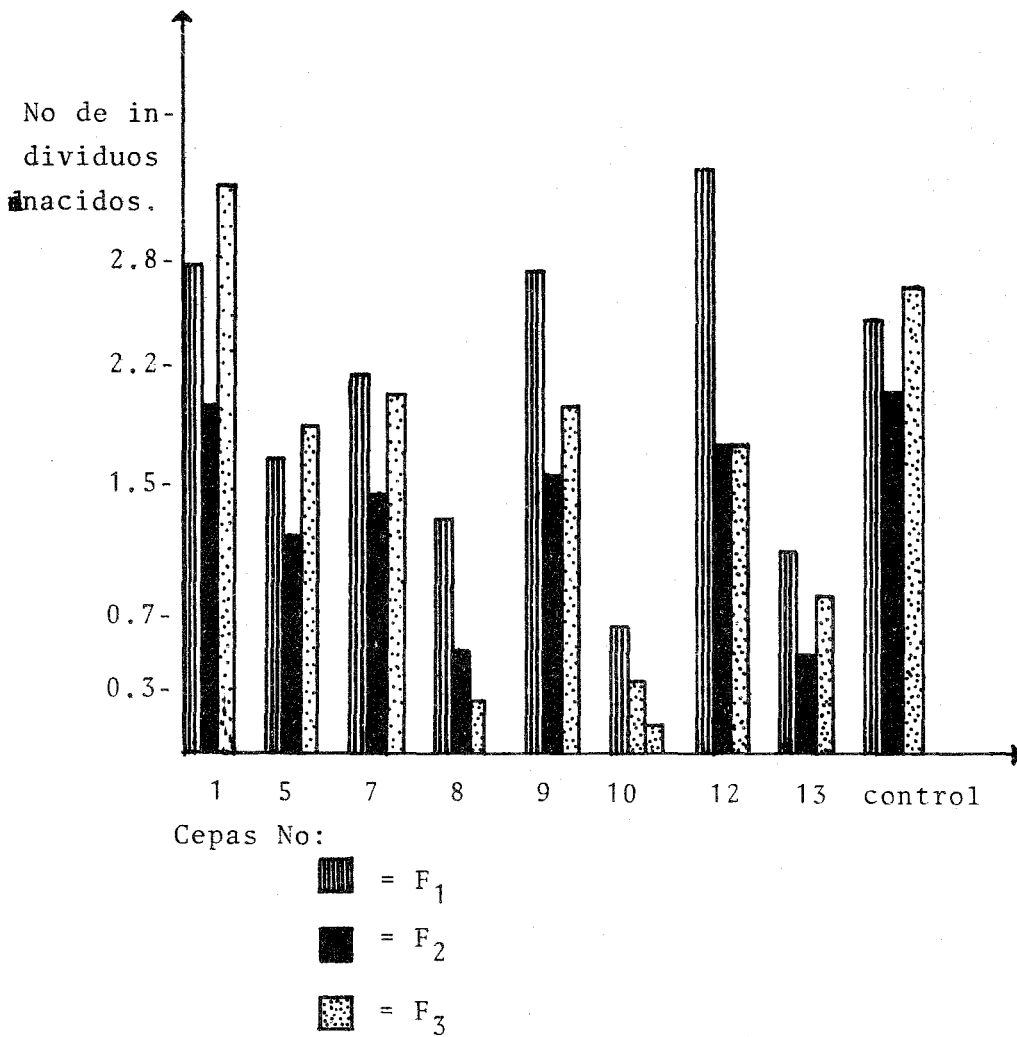
Gráfica de los datos de la tabla No 4.



Gráfica de los datos de la tabla No 5.



Gráfica de los datos de la tabla No 6.





6.- DISCUSION.

6.1. En primer lugar, fué importante conocer la anatomía y fisiología de los insectos, para poder separarlos por especie y sexo, controlar su reproducción y su manejo.

6.2. Posteriormente, teniendo en cuenta los trabajos de Musgrave y Miller (8.17), de Lum y Baker (8.15.), se buscó la presencia de micetomas y microorganismos, tanto en el estado larvario como en el adulto.

Se observó que en todas las larvas de ambas especies se encontraron micetomas en un 100%, los cuales no fueron detectados en los insectos adultos, esto es de acuerdo al conocimiento de que los micetomas sólo se presentan en la fase larvaria del insecto. Como sabemos los micetomas se forman por la acción de los microorganismos, los cuales persisten generalmente en el insecto adulto aún en ausencia de los micetomas. Todas las cepas de microorganismos aisladas por nosotros, fueron obtenidas de la fase adulta (4.4.).

También se encontró que sólo las hembras contenían microorganismos, estando estos situados en el intesti

no medio y en las gónadas. Por lo tanto si el microorganismo, es patógeno, sólo las hembras se verán afectadas; lo mismo resulta si el microorganismo es benéfico.

Por otra parte, se sabe que las hembras transmiten a sus huevecillos estos microorganismos (8.16), que en el caso de ser benéficos suplen a su hospedero con vitaminas del grupo B (8.1), apareciendo como simbiosis de éstos; y en el caso de ser patógenos le causan esterilidad al insecto.

Se encontró que la presencia de microorganismos - fué de 83% en S.oryzae y de 66% en S.granarius, por lo que consideramos más susceptible al primero a ser invadido por microorganismos que al segundo insecto.

Para poder aislar los microorganismos antes mencionados se diseñó un método basado en los conocimientos generales de aislamiento y los de desinfección aplicados a la obtención de microorganismos patógenos en plantas.

Se diseñaron tres medios de cultivo, basandose en los requerimientos esenciales de los microorganismos, con el objeto de utilizarlos en los aislamientos y en

la conservación de las cepas.

Al utilizarlos se encontró que el que mejores resultados dió fué el medio No 1 (3.34.) por lo que fué usado para todas las pruebas que se hicieron.

El medio No 2 (3.35.) y el medio No 3 (3.36.) que fué diseñado teniendo en cuenta las necesidades alimenticias de los insectos, dieron poco resultado, obteniéndose crecimientos escasos y lentos por lo que se optó por eliminarlos.

6.3. De los múltiples aislamientos que se hicieron, sólo 8 cepas fueron diferentes; pues se encontró que las demás presentaban las mismas características morfológicas (macroscópicas y microscópicas), y bioquímicas, de esas ocho cepas, por lo que fueron eliminadas por considerarse repeticiones de las primeras.

Se procedió a analizar las características de esas ocho cepas de acuerdo al método (4.5.) estando los resultados contenidos en los cuadros del No 1 al No 9. Este estudio se hizo en dos etapas.

En la primera se analizaron las ocho cepas en las siguientes características:

a) Estudio de las colonias (cuadros 1, 2 y 3).

- b) Apariencia microscópica (cuadro 3).
- c) Características del crecimiento en gelatina (cuadro 4).
- d) Movilidad, pH y relación al oxígeno libre (cuadro 5)

En la segunda etapa se hicieron tinciones con el objeto de estudiar su morfología (cuadro 6) y producción de pigmento (cuadro 9), y solo se estudiaron las características bioquímicas de cinco cepas, las cuales presentaron efectos significativos en la reproducción de estos insectos, con el objeto de determinar el género a que pertenecen (cuadros 7 y 8).

En esta forma pudimos clasificar a estos microorganismos hasta género, sin llegar a especie, por falta de material y metodologías adecuadas.

6.4. Las ocho cepas aisladas, fueron evaluadas (4.6.) para determinar su posible uso en el control biológico.

El método diseñado para la evaluación de los microorganismos fué satisfactorio. Uno de los problemas que se presentó fué la contaminación por hongos en la harina, ésto se debió al exceso de humedad en los frascos; este problema se corrigió poniendo menor cantidad de suspensión de cépa y agregando mas harina.

En un principio se hicieron pruebas con telas de Nylon de diferente número de malla, encontrándose que la No 200 fue la adecuada, por evitar la salida de los insectos a travez de ella y cerrar perfectamente la boca de los frascos, con lo que se tuvo controlado el experimento en todo momento.

6.5. Los resultados de cada prueba fueron tabulados y graficados; de el análisis de las gráficas podemos deducir lo siguiente:

En la gráfica No 1.- se observa que la cepa No 8 y la No 13 inhiben el crecimiento tanto en F_1 como en F_2 de S.oryzae. Por lo contrario la cepa No 9 favorece el crecimiento de S.oryzae.

En la gráfica No 2.- se observa que las cepas que inhiben el crecimiento de S.granarius son la No 8 No 10. - Las cepas que favorecen el crecimiento de S.granarius son la No 9 y No 1.

En la gráfica No 3 y No 4.- se demuestra que la mezcla de las cepas No 8+10 inhiben el crecimiento de ambas especies, y la mezcla de las cepas No 9+1 favorecen el crecimiento de ambas especies.

En la gráfica No 5.- se vuelve a observar que la cepa-

No 8 inhibe el crecimiento del insecto, y la cepa No 13 también tiene propiedades inhibitorias. Las cepas No 9 favorece otra vez el desarrollo de los insectos S.oryzae.

En la gráfica No 6.- las cepas inhibidoras del crecimiento son la No 1 y la No 9. La cepa No 12 favorece el crecimiento de la primera generación, pero en F_2 y F_3 ya no se observa ningún efecto.

Si analizamos los resultados observamos que las cepas No 8, No 10 y No 13 tienen propiedades patógenas para ambos insectos, inhibiendo su reproducción. Por el contrario, las cepas No 1 y No 9 tienen propiedades simbiotes que ayudan a un mejor crecimiento y proliferación de estos insectos.

Se observó también que las cepas No 8 y No 13 atacan en mayor grado a S.oryzae y la cepa No 10 a S.granarius. Lo mismo ocurre con los simbiotes, la cepa No 9 favorece más a la especie S.oryzae y la cepa No 1 a la especie S.granarius.

Las otras cepas que fueron evaluadas no presentaron efectos importantes en los insectos, por lo que no se les consideró significativas, quedando únicamente las-

cepas No 1, 8, 9, 10, y 13 como las que tuvieron efectos sobre estos insectos.

6.6. Basados en los estudios de clasificación ya mencionados y haciendo un análisis de los resultados de ellos, en relación a las cinco cepas seleccionadas, se encontró que estos microorganismos pertenecen a los siguientes géneros:

Cepa No	Familia	Género	Especie
1	Levadura	Cándida	sp.
8	Micrococaceas	Staphylococcus	sp.
9	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	sp.
10	Micrococaceas	Staphylococcus	sp.
13	Micrococaceas	Staphylococcus	sp.

6.7. Se hicieron algunas pruebas iniciales de patogenicidad en medios de cultivo (cuadro 9) con el objeto de ver si estos microorganismos pueden manejarse sin peligro, -siendo los resultados negativos, lo que indica que aparentemente no son patógenos al hombre, sin embargo es necesario profundizar mas en este aspecto.

7.- CONCLUSIONES.

Es importante el control de insectos plaga en los campos agrícolas y en los granos almacenados. Entre las especies importantes causantes del vaciado de los granos tenemos a Sitophilus oryzae y a Sitophilus granarius.

El estudio microbiológico que se llevó a cabo en ambas especies puede ser de gran utilidad para un posible control Biológico de éstos insectos plaga.

Creemos que es de suma importancia el desarrollo de nuevos estudios sobre el Control de insectos plaga ya que éstos causan serios daños a la agricultura, por consiguiente, a la economía Nacional.

8.- BIBLIOGRAFIA..

8.1. Baker J.E. (1976)

"Total Dietary Amino Acid and Lysine, Requirements for Larvae of *Sitophilus oryzae*"

J.Georgia Entomol. Soc. 11 (2): 176-81. (E.U.A.).

8.2. Bap D.Reddy (1951)

"Determination of Sex in Adult Rice and granary -- Weevils"

The Pan-Pacific Entomologist vol. XXVII-No 1: 13-16. (E.U.A.).

8.3. Bergey, David Hendricks (1974)

"Bergey's Manual of Determinative Bacteriology"

18 Ed. Williams I Wilkins

Baltimore (E.U.A.).

8.4. Bradley S.G. (1974)

"Molecular Microbiology"

New York, J.Wiley (E.U.A.).

8.5. Burns E.C., Wilson B.H., and Tower B.A. (1961)

"Effect of feeding *Bacillus Thuringiensis* to Caged Layers for Fly Control"

Journal of Economic Entomology vol.54 (5):913-15(EUA).

- 8.6. Bernard D.Davis (1973)
"Microbiology"
I.Row, 2a.Ed.
Harper (E.U.A.).
- 8.7. De Bach (1968)
"Control Biologico de las Plagas de Insectos y
Malas Hierbas"
Cia. Editorial Continental S.A. (México, D.F.).
- 8.8. Grain Lauhoff Co
"Insect Pest of the Food Industry"
Danville, Illinois. (F.U.A.).
- 8.9. Hall M.Iroin and Dunn P. (1958)
"Susceptibility of some Insect Pests to Infection
by Bacillus thuringiensis Berliner in Laboratory-
Tests"
Journal of Economic Entomology vol.51 (3): 296-8
(E.U.A.).

8.10. Jawetz E. (1973)

"Manual de Microbiología Medica"

5 Ed. El Manual Moderno, S.A.

México, D.F.

8.11. Laguna José (1969)

"Bioquímica"

2 Ed. La Prensa Medica Mexicana

México, D.F.

8.12. Lehninger L. Albert (1972)

"Bioquímica"

Ediciones Omega S.A.

Barcelona (España).

8.13. Liteta M. (1971)

"Short Communication and Additional Aedeagal Character for Distinguishing *Sitophilus zeamais* Motsch, from *Sitophilus oryzae* (L)"

J. Stored Prod. Res. 1971, vol. 6:351-52

Pergamon Press. Printed in Great Britain

- 8.14. Lum P.T.T. and Baker J.E. (1971)
"Accessory cells of the Mycetome in the Rice Weevil,
Sitophilus oryzae: Post-Embryonic Development"
Ann. of Entomol. Soc. Am. vol 68: 1074-6 (E.U.A.).
- 8.15. Lum P.T.M. and Baker J.E. (1973)
"Development of Mycetomes in Larvae of *Sitophilus*
granarius and *Sitophilus oryzae*"
Ann. Entomol. Soc. Am. vol. 66: 1261-3 (E.U.A.).
- 8.16. Musgrave A.J. (1964)
"Insect Mycetomes"
The Canadian Entomologist vol. 96:377-89 (Canada).
- 8.17. Musgrave A.J. and Miller J.J. (1953)
"Some Microorganisms Associated with the Weevils
Sitophilus granarius (L) and *Sitophilus oryzae* (L)"
The Canadian Entomologist vol. LXXXV: 387-90
(Canada).
- 8.18. Ruschel G.
"On Problems of Synonymy in the *Sitophilus oryzae*
Complex".
A.M.N.H. ser 13, vol. iv. : 241-4

- 8.19. Snodgrass R.E. (1935)
"Principles of Insect Morphology"
1 Ed. Mc.Graw Hill Book Co. Inc.
New York, (E.U.A.).
- 8.20. Tanada Y.
"Microbial Pesticides"
Division of Invertebrate Pathology
University of California, Berkely (E.U.A.).
- 8.21. Umbreit Wayne William (1959)
"Advances in Applied Microbiology"
vol.3 New York, Academic Press. (E.U.A.).
- 8.22. Wigglesworth V.B.
"The Principles of Insect Physiology"
7 Ed. Chapman and Hall, London.