

MICROORGANISMOS ASOCIADOS CON LA BABOSA COMUN DEL FRIJOL

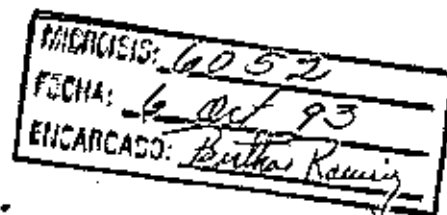
Seraxinula antillarum (Becker) QUE CAUSAN

MORTALIDAD EN EL LABORATORIO.

POR:

CLAUDIA PATRICIA PINTO CASTILLO

Tesis presentada
como requisito previo a la
obtención del título
de Ingeniero Agrónomo.



ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA

Abril de 1988.

BIBLIOTECA WILSON POPPEL DE
ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA
APARTADO 63
TEGUCIGALPA HONDURAS

MICROORGANISMOS ASOCIADOS CON LA BABOSA COMÚN DEL FRIJOL

Sarasipula entillarum (Becker) QUE CAUSAN
MORTALIDAD EN EL LABORATORIO.

POR:

CLAUDIA PATRICIA PINTO CASTILLO

El autor concede a la Escuela Agrícola Panamericano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para los usos que considere necesarios. Para otras personas y otros fines, se reservan los derechos del autor.

Claudia Patricia Pinto

CLAUDIA PATRICIA PINTO CASTILLO

Abril 1988

DEDICATORIA

A Dios, por haberme guiado e iluminado en todas las facetas de mi vida y me dió a la mejor madre del mundo.

A la memoria de mi padre, Napoleón Pinto (QEPD).

A mi madre, Iris Esperanza viuda de Pinto con todo mi amor, admiración y respeto por haberme dado la vida, un digno ejemplo, la motivación para superarme y su infinita comprensión. Gracias Mami.

A mis hermanos, Martha Lorena Pinto e Iris Nohemy Pinto y Jesús Napoleón Pinto por ser como son, todo mi amor y cariño.

A Aurclio Revilla y Sergia de Revilla, por brindarme el apoyo y cariño durante mis cuatro años de estudios en el Zamorano y al darme su confianza considerandome como una hija.

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mis Consejeros, Doctor EDMUNDO POUJOL y al Doctor KEITH L. ANDREWS por su orientación en la realización de este trabajo, así como también al Doctor DANILO DUBON y a la Licenciada SAGRARIO de CALDERON por su ayuda en los procesos de identificación de los microorganismos en el laboratorio. Al Ingeniero OSCAR COSENZA por sus consejos de procedimientos de laboratorio.

Al Ingeniero AUBELIO REVILLA por haber tenido la paciencia para ayudarme a revisar este trabajo, gracias por sus valiosas sugerencias, así como también por la amistad, cariño, acogida y consejos que me brindó el y su esposa SERGIA DE REVILLA.

Al Doctor LEONARDO CORRAL por disponer de su tiempo para orientarme con los análisis estadísticos, así como también a la Lic. SUYAPA de MEYER, Muchas Gracias.

A mis colegas JAIME HERRERA y MARIA JOSE RICO por su ayuda desinteresada. Gracias.

A mi colega, compañera y amiga ELSI ALICIA SORTO por haberme brindado su amistad y apoyo durante todo este año. Mil Gracias.

Al BANCO INTERAMERICANO DE DESARROLLO por haber financiado mis estudios en esta Institución.

TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
Importancia Económica	3
Anatomia	4
Biología y Comportamiento	7
Hábitos Alimenticios	10
Métodos para el Control	12
Control Cultural	12
Control Químico	14
Control de Babosas Con el Uso de Extractos de Plantas	18
Control Biológico	20
III. MATERIALES Y METODOS	26
Identificación del Agente Etiológico	26
Aislamientos	27
Inoculación de las Muestras en los Medios de Cultivo	29
Identificación de los Microorganismos	30
Inoculación del Cultivo Puro en Babosa Sanas	31
Metodología Experimental	34
Reaislamiento de Microorganismos de Babosas Inoculadas	36
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	37
Del Laboratorio	37
Del Ensayo	41
V. CONCLUSIONES	50

VI. RECOMENDACIONES	51
VII. RESUMEN	53
VIII. LITERATURA CITADA	55
IX. ANEXOS	63

LISTA DE CUADROS

Cuadro		pág.
1	Método de Concentración de McFarland	32
2	Descripción de las Cinco Colonias Puras	38
3	Resultados de las Reacciones de las Cinco Colonias Puras a las Pruebas Bioquímicas	39
4	Número de Babosas Vivas y Muertas Que Fueron Inoculadas con el Bacilo Gram Negativo No Fermentador	43
5	Número de Babosas Vivas y Muertas Que Fueron Inoculadas con la Bacteria <u>Citrobacter freundii</u> Por Tratamiento y Días Promedio a la Muerte	44
6	Resultados de la Prueba Duncan de Separación de Medias de los Tratamientos en Donde se Inoculó el Bacilo Gram Negativo No Fermentador	47
7	Resultados de la Prueba Duncan de Separación de Medias de los Tratamientos en Donde se Inoculó la Bacteria <u>C. freundii</u>	47

LISTA DE ANEXOS

Anexo		pág.
1	Agar Eosina de Azul de Metileno	63
2	Agar King (KB)	64
3	Gelosa Sangre Con Base de Casman	65
4	Agar MacConkey	66
5	Tinción de Gram Modificada Por Hucker	67
6	Agar Triple Azúcar Hierro	68
7	Agar Citrato de Simmonds	69
8	Agar Urea	70
9	Agar Lisina Hierro	71
10	Medio MIO (Movilidad Indol Ornitina)	72
11	Medio SIM	73
12	Reacciones Esperadas de los Diferentes Sustratos	74
13	Descripción de la Bacteria Identificada Utilizada en el Estudio	75

I. INTRODUCCION

La babosa es una plaga que causa serios daños en varios cultivos alimenticios. Además, es un portador de nemátodos que pueden causar enfermedades a los humanos.

En el Departamento de Protección Vegetal de la Escuela Agrícola Panamericana (EAP), Honduras se lleva a cabo la crianza de la babosa, Sarasinula antillarum (Becker), para ser utilizadas en diferentes propósitos de investigación, encaminados al conocimiento de los hábitos de comportamiento de la babosa en condiciones de laboratorio y en condiciones de campo.

En el año de 1986, se observó la presencia de lesiones en la piel de algunas babosas en la parte media dorsal. Estas lesiones variaban de tamaño y eran de forma cóncava. A medida que transcurría el tiempo las lesiones aumentaban de tamaño hacia los extremos longitudinales de las babosas, tomando una coloración blanquesina o amarillenta, cubiertas por una secreción acuosa. Pocos días después las babosas se hinchaban y morían.

En la Escuela Agrícola Panamericana no se había presentado casos similares al anteriormente descrito y por esa razón se decidió realizar la presente investigación.

La presente investigación tiene como objetivos:

1. Identificar el agente etiológico de la enfermedad.
2. Conocer el grado de virulencia del agente etiológico.
3. Considerar la posibilidad del uso de este agente etiológico para el control biológico de la babosa.

II. REVISION DE LITERATURA

Importancia Económica de la Babosa

La babosa común del frijol, Sarasinula antillarum (Becker), se ha reportado en Centro América desde el año 1967 (Andrews, 1985). En Honduras, este molusco tiene gran importancia económica, por ser causante de daños en el cultivo de frijol (Secretaría de Recursos Naturales, 1976). Cada año se ha ido incrementando su población en diferentes zonas frijolerías del país (Córdoba, 1981). Actualmente la babosa es el factor más limitante en la producción del frijol, y se estima que unos 50,000 agricultores hondureños han sido afectados en sus cultivos (Andrews, 1985).

Además las babosas son hospederos intermedios de los nemátodos Angiostrongylus costaricensis (Morera y Céspedes) y A. cantonensis (Chen) los cuales son parásitos de los mamíferos, incluyendo al humano (Morera y Ash, 1970). El hombre se infecta por comer alimentos contaminados por la baba o lígula de la babosa (Zuñiga et al., 1983; Kaminsky et al., 1986; Sierra y Morera, 1972; Morera y Céspedes, 1971; Cortés y Lobo-Sanahuja, 1980; Malek, 1981).

Clasificación de la Babosa

Según Thomé (1975), la babosa S. antillarum pertenece al Reino Animal, Filo Molusca, Clase Gastropoda, Subclase

Pulmonata, Orden Stylommatophora. Es una de las 21 especies que forman la familia Veronicellidae (Thomé, 1975).

Anatomía

Las babosas de la familia Veronicellidae son pequeños gastrópodos terrestres, subcilíndricos y aplanados, de simetría bilateral sin segmentación y de consistencia suave, apariencia húmeda, color café claro. El cuerpo es de un solo segmento, el cual está diferenciado en dos partes: una masa visceral, que contiene la mayoría de los órganos y una masa céfalopodal (Runham y Hunter 1970, 1983; Mancía, 1973).

Se caracterizan por la reducción o ausencia completa de la concha que es una característica de la mayoría de los gastrópodos, lo cual las ha obligado a adaptarse a vivir en lugares húmedos (Russell y Hunter, 1964). El cuerpo tiene una apariencia húmeda y ligosa, debido al moco que secreta continuamente. Esto le permite defenderse, hasta cierto punto, de la sequedad atmosférica (Mancía, 1973). Cuando es molestada secreta una exudación viscosa que le sirve como mecanismo protector contra depredadores y para remover sustancias nocivas de la superficie del cuerpo (Chichester y Getz, 1973). Las secreciones anteriores producen la pérdida de agua del cuerpo que tiene que ser compensada por los alimentos ingeridos y por la absorción cutánea del rocío o la lluvia (Judge, 1973).

Algunas babosas presentan una capa protectora llamada manto, que es secretado por un grupo especializado de células de la parte media del dorso (Gates y Gordon, 1975; Runham y Hunter, 1970), pero los veronicéllidos no tienen esta capa (Mancia, 1973).

La cabeza no está claramente diferenciada del resto del cuerpo pero generalmente hay una delgada membrana en la región del cuello; se puede diferenciar cuando la masa céfalopodal está extendida, por medio de dos pares de tentáculos que sufren contracción en el orden Soleolifera e inversión en el orden Stylommatophora. El par de tentáculos superiores llevan en su extremo distal los ojos; el otro par de tentáculos se encuentran en la parte inferior; estos son más cortos y contienen los órganos del olfato y tacto (Barnes y Weil, 1944; Barnes y Weil, 1945; Runham y Hunter, 1970; Mancia, 1973).

La boca está situada en la parte inferior de la cabeza rodeada por un complejo sistema de labios, glándulas y lóbulos bucales. El labio superior está armado de hileras irregulares de dientes pequeños y afilados, de origen quitinoso, formando en conjunto con las mandíbulas, el órgano llamado rádula, la cual le sirve para raspar el alimento (Hunter, 1966; Runham y Hunter, 1970).

La parte ventral del cuerpo está formada por una gruesa capa muscular, llamada pie ventral o suelo, con zonas transversales cuyas contracciones le sirven para la locomoción (CENTA, 1974; Mancía 1973).

En miembros del orden Stylommatophora, en la parte derecha y poco detrás del tentáculo superior, visto de enfrente, se encuentra la boca que también le sirve para sacar al exterior su órgano genital masculino que a la vez posee la estructura del testículo. En la parte media derecha ventral se encuentra el poro genital femenino el cual es la glándula reproductora, que posee a su vez la estructura del testículo y el ovario; constituyendo un órgano que se denomina "ovotestis" (Mancía 1973; Judge 1972; Runham y Hunter, 1970). Las babosas son hermafroditas, pero normalmente tiene fecundación cruzada, en donde cada una de las babosas actúa como macho y como hembra, siendo ambas fecundadas (Mancía 1973).

Anatomía Interna

Las babosas poseen respiración pulmonar, donde el aire penetra a través de un orificio contractil llamado pneumostoma que se abre y se cierra (Mancía, 1973; Mancía 1971; Paul, 1978, citado por Coto 1983). Junto al pneumostoma se encuentra un orificio en donde desemboca el recto y la uretra.

El pulmón es el resultado de la modificación de la cavidad paleal, en las que sus paredes, especialmente su techo,

están muy vascularizados, hecho que permite el intercambio gaseoso con el medio (Paul 1978, citado por Coto 1983).

En especies del orden Stylommatophora, el pulmón se localiza detrás del margen medio del manto (Chichester y Getz, 1973; Anon., 1974; Runham y Hunter, 1970).

Thomé (1975) reportó que la respiración en la familia Veronicellidae es exclusivamente cutánea.

Biología y Comportamiento

Las babosas son hermafroditas, cuyo conducto hermafroditico esta generalmente dividido por pliegues longitudinales, en un spermiconducto que alcanza su máximo desarrollo en el tiempo de la cópula y un oviducto que alcanza su máximo desarrollo antes de la postura de los huevos. El número de óvulos y espermatozoides producidos pueden ser afectados por una serie de factores ambientales: temperaturas bajas demoran el desarrollo de la gónada; temperaturas altas causan una reducción en el número de oocitos producidos (Lusis 1966, citado por Coto 1983; Runham y Hunter, 1970; Smith, 1966; Stephenson y Bardner, 1976). La luz continua y de alta intensidad causa inhibición en el desarrollo de los gametos; luz continua de baja intensidad provoca una rápida maduración del esperma (Pelluet y Henderson, 1954; Runham y Hunter, 1970).

Normalmente tienen fecundación cruzada; el esperma es transferido en una masa viscosa o en paquetes en un spermatoforo (Runham y Hunter, 1970), el cual es almacenado en una

espermateca que está conectada al saco del pene por un conducto muy corto.

Las babosas se reproducen por huevos. La postura ocurre frecuentemente entre los 10 y 20 días después de la fecundación de los óvulos; en algunos casos puede tomar muchos más tiempo, dependiendo de las condiciones ambientales (Carrick, 1938; Anon., 1942; Runham y Hunter, 1970).

Los huevos son translúcidos, puestos en masa, unidos por un ligamento o secreción pegajosa transparente; generalmente son ovalados y al cabo de unos días son de color amarillo claro. Su longitud varía de dos a cinco milímetros y de tres milímetros de ancho y el número de huevos por ovipostura varía de acuerdo a la especie entre 10 y 100 huevos, pero el promedio fluctúa entre 50 a 60 huevos. El número de oviposiciones ocurre de dos a tres por año dependiendo del clima y de la especie de babosa (Judge, 1972; Secretaría de Recursos Naturales, 1974; Dundee, 1977; Mancía, 1971a).

El embrión completa su desarrollo en el huevo; la duración del desarrollo varía, y es gobernada principalmente por la temperatura del ambiente. Después de la oviposición las babosas jóvenes se mantienen cerca de los huevos y aunque ellas se dispersan después de un tiempo no hay evidencia de que migren a largas distancias. Los huevos son colocados en lugares húmedos, bajo hojarasca, tablas, escombros, o bien a varios centímetros bajo tierra o depositados en el campo abierto (Stephenson y Bardner, 1976; Mancía, 1971).

espermateca que está conectada al saco del pene por un conducto muy corto.

Las babosas se reproducen por huevos. La postura ocurre frecuentemente entre los 10 y 20 días después de la fecundación de los óvulos; en algunos casos puede tomar muchos más tiempo, dependiendo de las condiciones ambientales (Carrick, 1938; Anon., 1942; Runham y Hunter, 1970).

Los huevos son translúcidos, puestos en masa, unidos por un ligamento o secreción pegajosa transparente; generalmente son ovalados y al cabo de unos días son de color amarillo claro. Su longitud varía de dos a cinco milímetros y de tres milímetros de ancho y el número de huevos por ovipostura varía de acuerdo a la especie entre 10 y 100 huevos, pero el promedio fluctúa entre 50 a 60 huevos. El número de oviposiciones ocurre de dos a tres por año dependiendo del clima y de la especie de babosa (Judge, 1972; Secretaría de Recursos Naturales, 1974; Dundee, 1977; Mancía, 1971a).

El embrión completa su desarrollo en el huevo; la duración del desarrollo varía, y es gobernada principalmente por la temperatura del ambiente. Después de la oviposición las babosas jóvenes se mantienen cerca de los huevos y aunque ellas se dispersan después de un tiempo no hay evidencia de que migren a largas distancias. Los huevos son colocados en lugares húmedos, bajo hojarasca, tablas, escombros, o bien a varios centímetros bajo tierra o depositados en el campo (abierto) (Stephenson y Bardner, 1976; Mancía, 1971).

Estudios realizados por Carrick (1938) y Getz (1959) con la familia Limacidae concluyeron que para obtener un desarrollo normal de los embriones de los huevos, el suelo debe tener un contenido de humedad entre el 40 y 80 %, antes y después de la oviposición y sugieren que el límite de temperatura óptimo para la incubación y un desarrollo normal de adultos, está cerca de 21 C, correspondiendo este límite aproximadamente con el de oviposición, con un máximo entre 21 C y 23 C, y un mínimo de 15 C; cuando la temperatura es menor de 15 C los huevos se invernicen. Según Mancía (1973), a 27 C los huevos de la babosa Vaginulus plebeius (Fisher) eclosionan en 24 días y las nuevas babosas alcanzan su madurez sexual de tres a cuatro meses después con temperaturas de 16 C. A temperaturas de 25 C los huevos eclosionan entre 28 y 30 días; este período de tiempo se acorta a temperaturas altas. Stephenson y Bardner (1976) reportan que la oviposición en la familia Limacidae ocurre en suelos con contenidos intermedios de agua. Para el desarrollo, el contenido óptimo de agua del suelo es de 70 - 80 % de la capacidad de campo.

Generalmente los huevos eclosionan entre tres a cuatro semanas, dependiendo de la especie y de las condiciones ambientales (Carrick, 1938; Anon., 1942; Nelson, 1975; Newell, 1967; Runham y Hunter, 1970).

La temperatura y la humedad son factores fundamentales que afectan el tiempo que transcurre entre la oviposición, desarrollo de embriones y crecimiento de adultos.

Estos factores junto con el alimento determinan el tiempo en que la babosa llega a la madurez sexual y comienza su reproducción (Carrick, 1938; Anon., 1942).

Las babosas recién eclosionadas parecen una partícula de múcilago en movimiento; después de algunas horas los ojos aparecen como regiones oscuras y la babosa toma un color rosado y conforme se va alimentando va adquiriendo el color propio de cada especie (Mancia, 1971; Simpson, 1901).

Metcalf y Flint (1979) mencionaron que la babosa joven es semejante al adulto; su diferencia es en tamaño y capacidad de alimentarse. En babosas es muy difícil medir longevidad; sin embargo, se calcula que viven alrededor de dos años (Dundee, 1977).

Hábitos Alimenticios

Andrews et al., 1985 mencionan que la babosa Sarasinula plebeia (Fisher), se alimenta de plantas que pertenecen a varias familias, especialmente las siguientes: Solanaceae, Compositae, Leguminosae y Commelinaceae; sin embargo, en ausencia de las más apetecibles, consumen follaje de ciertas especies de las familias Amaranthaceae, Convolvulaceae, Rutaceae, Euphorbiaceae, Chenopodiaceae, Umbelliferae, Rubiaceae, Cruciferae, Portulacaceae y Oxalidaceae.

Las babosas jóvenes consumen el follaje a excepción de las nervaduras, mientras las babosas adultas consumen todo el follaje. La semilla puede ser consumida totalmente; además,

se reportan daños a las vainas (Schwartz y Gálvez, 1980).

Por otra parte King y Saunders (1984) reportan que las babosas provocan daño a las plantas del frijol, defoliando y atacando a las vainas. Las babosas jóvenes y adultas raspan con la rádula la parte foliar de la planta de frijol, dejando solo los bordes despedazados de las venas mayores; de esta forma consumen plantas enteras en los primeros 20 días de crecimiento del cultivo del frijol. El daño severo es a menudo local, pero puede ser general, esporádico y relacionado con el tiempo húmedo prolongado o nublado.

Se reporta que en época seca y caliente las babosas entran en inactividad temporal por lo tanto el daño ocasionado a las plantas es menor. El ataque intenso a los cultivos ocurre al brotar las siembras de frijol y maíz cuando la humedad relativa es alta (Howitt y Cole, 1962).

La mayor intensidad de ataque de babosa veronicéllidas ocurre a lo largo del borde de los campos e invaden progresivamente, si la vegetación y los residuos proveen amplia protección a la babosa durante el día (Schwartz y Gálvez, 1980). La supresión de malezas por herbicidas puede conducir a la concentración del ataque en los brotes jóvenes de las babosas de la familia Limacidae, como sucede en el caso de los de árboles de lúpulos, los cuales pueden ser fuertemente dañados (Alford y Upstone, 1980).

Mancia (1971a) reportó que el mayor daño al frijol ocurre desde los 8 a 20 días después de la siembra, durante el cual puede llegar a ocasionar pérdidas totales; posteriormente se alimenta de las vainas a las cuales ocasiona un daño menor.

La forma más común de daño por las babosas es el raspeo de los frutos o de las hojas del cafeto (Morstatt, 1912, citado por Stephenson y Bardner, 1976), o de las brassicas y por la perforación de semillas en granos recién plantados (Purse-glove, 1968). Rao (1965) reportó que las babosas son plagas del caucho joven. Atacan la papa en Inglaterra según Stephenson y Bardner (1976). Los daños causados por las babosas no son fácilmente reconocible y puede ser que el daño de las babosas en cultivos tropicales hayan sido atribuidos a alguna otra plaga (Hunter y Runham, 1971).

Métodos Para el Combate de Babosas

Control Cultural

Uno de los métodos, consiste en una buena preparación del terreno antes de la siembra, que incluya arada, rastreo, nivelación, drenajes, eliminación de rastrojos y control de malezas (Mancia, 1971; Runham y Hunter, 1970).

Una buena preparación del terreno incluye arado a una profundidad de 18 - 20 cm., dos pasadas de rastra, nivelación y drenaje, la eliminación de residuos de la cosecha anterior

incluyendo malezas y basuras. Estas prácticas exponen a las babosas y sus huevos quedan expuestos a la luz solar y evitan darles refugio (Rodríguez).

Gould (1962), Hunter et al., (1968), Winfield et al., (1967), Hunter y Simonds (1971) y Stephenson y Bardner (1976) reportaron que las labores del cultivo antes y durante el período de crecimiento de los cultivos da un método efectivo en control de babosas, que puede ser debido al impedimento físico por ausencia de grandes fracturas y de espacios en el suelo, que limitan el movimiento de las babosas en la búsqueda de alimento, así como también reducen la protección de las babosas a la sequía, a las heladas o de los predadores, al quedar expuestas. También debido a un efecto mecánico, donde los implementos usados para el laboreo matan a un cierto número de babosas. Pero existen desventajas al hacer laboreos extras por ser muy caros en comparación al control químico y no se pueden realizar en suelos muy pesados. Otro método de control cultural consiste en cultivar variedades de plantas que sean menos susceptibles al ataque, especialmente en papa, por las diferencias en composición química, así como también sembrar o cosechar las plantas de tal modo que el período de susceptibilidad no coincida con el tiempo favorable para la actividad de las babosas.

Este método de control se está haciendo cada vez más importante, debido al descubrimiento de nuevos productos químicos. Según Hunter y Symmonds (1971) ninguno de los compuestos organoclorados u organofosforados han sido desarrollado en gran escala como molusquicidas activos contra babosas.

Sin embargo, un tercer grupo, los carbamatos, han demostrado ser muy activos en sus propiedades para matar babosas (Hunter y Johnson, 1970; Ruppel, 1959; Hunter y Runham, 1976). El carbamato experimental tiocarboxina "talcord", es un poderoso veneno de contacto contra las babosas (Stephenson, 1971, 1972a,b).

Los productos químicos pueden ser aplicados en diferentes estados: primero, en solución o suspensión aplicados en forma de rocío (Hunter y Runham, 1971; Mancía, 1971); segundo en forma de cebos. Los cebos comercialmente se fabrican en forma de comprimidos para facilitar su distribución. El inconveniente con la primera forma de aplicación es que las babosas tienden a limpiar la superficie de su cuerpo por medio de las secreciones acuosas y en el segundo caso la forma de presentación de los cebos es importante ya que tiene que ver con la eficiencia. Un peso dado de píldoras pequeñas puede significar más puntos por unidad de área para matar babosas, que el mismo peso en píldoras más grandes (Hunter y Runham, 1971).

El control químico se puede realizar con los siguientes productos:

Sulfato de Cobre

El uso de sulfato de cobre fué pionero en matar al caracol Lymnaea truncatula (MÜLL.), descubierto por Walton y Jones (1925). Luego por estudios de Anderson y Taylor (1926), se estableció que también mataba babosas. El sulfato de cobre se aplica en forma cristalina, en forma de polvo en dosis de 10 a 20 Kg/ha, para facilitar la aplicación, esta cantidad es mezclada con ciertos fertilizantes como ser: sulfato de potasio, y fertilizantes a base de magnesio. También se usa en asperciones diluyendo la dosis anterior en 400 litros de agua/ha. Se recomienda como pre emergente y aplicarlo en las noches húmedas y tibias o temprano en la mañana, que es cuando la actividad de las babosas es mayor (Dinther, 1973).

Cianamina de Calcio

Se aplica espolvoreado dos veces, usando de 100 a 150 Kg/ha durante la noche, con un intervalo de una hora. El cianido de calcio también se ha recomendado como un tratamiento pre emergente para las babosas (Fabcr y Zwatz, 1967, citado por Dinther, 1973). Este compuesto es generalmente usado como fertilizante; tiene un buen efecto y trabaja como veneno de contacto (Dinther, 1973).

Metaldehido

Conocido como "meta", el metaldehido es un producto químico eficaz contra los gastrópodos (Martin, 1968). Según Gimingham y Newton (1937), fue el primer producto usado extensivamente para el control de babosas desde 1936. Este producto químico es inflamable y actúa como veneno ya sea por contacto o por ingestión (Dinther, 1973; Gragg y Vincent, 1952).

Normalmente se usa en forma de cebo, el cual es preparado mezclando 200 gr del polvo de metaldehido con 12 Kg de afrecho fresco de trigo o arroz y siete litros de agua. En esta mezcla el metaldehido es el ingrediente activo, el afrecho es el agente de transporte. Cuando el cebo ha sido preparado en casa (cebo casero), se aplica a razón de 30 Kg/Ha, en pequeñas cantidades, cada 30 cm de distancia. Cuando se usa cebo comercial en forma de comprimidos, que contienen de 3 a 6 por ciento de ingrediente activo. Cuando la concentración del comprimido es de seis por ciento se esparcen a razón de de 3 a 5 Kg/Ha (Dinther, 1973). Se recomienda aplicar estos cebos durante la noche para obtener una máxima eficacia, especialmente cuando la noche esta húmeda y tibia. El efecto de este producto es la reducción de la capacidad de locomoción de las babosas lo cual las expone por más tiempo a la desecación (Thomas 1948; Crowell, 1977). El metaldehido también puede ser usado en forma de aerosol o en polvo, como veneno de contacto. Si esta formulado a 50 por ciento de polvo mojable, puede ser aplicado a razón de 10 Kg

en 500 a 100 litros de agua /Ha (Mead, 1961). Pero usualmente las asperciones de metaldehído dan resultados insatisfactorios, a menos que se apliquen en concentraciones altas, cuando las babosas están activas (Hunter y Runham, 1971).

Según Berg (1976), Franz y Krieg (1976) citado por Dint-her (1973) y Hairston et al., (1975) las babosas terrestres son muy difíciles de controlar químicamente, usando preparaciones de metaldehído, particularmente en un ambiente continuamente húmedo o durante la estación lluviosa; estas consideraciones han dado la posibilidad de mantener las poblaciones de babosas bajo los valores de las media biológicas.

Methiocarb

Este es un insecticida y un acaricida, con un amplio rango de acción y cierta actividad residual (Martin, 1968). Posee también buenas características para matar gastrópodos, aún a alta humedad relativa del ambiente (Martin y Forrest, 1969). Este carbamato se introdujo con el nombre de "mezurol" en 1965, y fue comercializado como molusquicida, eg en forma de comprimidos conteniendo 4 por ciento de ingrediente activo. Este puede ser aplicado a razón de 5 Kg/Ha (Dint-her, 1973; Crowell, 1967).

Se usa fibra de coco impregnado de carbolineo (coal tar) alrededor de tronco del árboles de frutales, se coloca ceniza de madera alrededor de los canales o asequias alrededor de los jardines, fibras de coco o empapado con carbolineo o soluciones de sulfato de cobre de 4 a 10 por ciento de concentración (Mead, 1961).

Se han probado diez herbicidas triazinas que han demostrado ser tóxicos a las babosas (Stephenson, 1963); su toxicidad esta relacionada a su solubilidad en el agua. A mayor solubilidad en agua, mayor toxicidad; esto está probablemente relacionado al facilidad de penetración de la capa de moco que cubre a la babosas. El herbicida ioxynil, fue encontrado venenoso para las babosas (Wain, 1963). Stephenson (1967a), demostró que la sal sódica actúa como repelente para las babosas y es venenoso cuando se inyectaba directamente al estómago de la babosa. Crowell (1977) encontró que muchos herbicidas a base de dinitros son también eficaces en el control de babosas.

Control de Babosas con el Uso de Extractos de Plantas

Coto (1983) recomienda que las especies Canna lialia ensiformis L. (semilla), Nerium oleander L. (hojas y tallos) y Thevetia peruviana A. (hoja) podrían ser utilizadas en el futuro como agentes promisorios de bajo costo para combate de

babosas; ya que supone que estas plantas al ser consumidas por la babosas en un bajo porcentaje, presentan una resistencia de tipo no preferencia que se caracteriza por la acción adversa de la planta sobre el comportamiento de la babosa. Sugiere evaluar en forma más detallada otras especies de plantas de las familias Leguminosae y Apocynaceae.

Cantoral (1986) probó diferentes técnicas para el control de babosas, utilizando bulbos de ajo, Allium sativum L.; bulbos de cebolla, Allium cepa L.; hojas de narciso, N. olcander y hojas de chilindrón, T. ovata. Estas partes de la planta se molieron separadamente, se disolvieron en una proporción de 1 Kg de cada uno de los productos vegetales, 1 litro de agua, y 0.125 Kg de jabón de coche (producto de fabricación casera, elaborado a base de grasa de cerdo y ceniza de restos vegetales). Cantoral concluyó que en general para todos los tratamientos no hubo un efecto repelente o atrayente. Observó que los tratamientos producto de los extractos de botánicos, el N. olcander cocido más jabón de coche presentó el menor número de plantas dañadas y la mayor rentabilidad la cual fue de 175 por ciento. Sugiere realizar otras investigaciones sobre principios activos, dosis óptimas y formulaciones de los extractos vegetales.

Cordon (1986) evaluó el efecto de extractos vegetales de las siguientes plantas para el control de la babosa de la babosa (Mollusca: Veronicellidae): el tallo y follaje del chichicaste, Cnydoscolus multiflobulos Pax.; el fruto del

luruche, Jacquinia aurantiaca Ait. Hort.; el follaje de la maleza, Euphorbia continifolia L.; el fruto y follaje del higuerrillo, Ricinus comunis L.; follaje de sábila, Aloe vera L.; y la planta entera de apasina, Petiveria alliacea L. Usó 227 gramos por 2 litros de agua para cada tratamiento, en sus preparaciones de cocido manteniendolo en ebullición por 30 minutos y crudo picado que se le dejó reposar por 24 horas pre asperción. Cordon concluyó, que los extractos de J. aurantiaca efectuaron un mejor control de las poblaciones de babosas, no es tóxica al esparjarla al frijol, y además se obtuvo la mayor rentabilidad por el uso del extracto del fruto de luruche crudo. Cordon sugiere que se deben realizar estudios para determinar el ingrediente activo del fruto de luruche, Jacquinia aurantiaca y las dosis adecuadas para el control de babosas.

Control Biológico

Wright (1968) ha enfatizado las dificultades encontradas, pero los resultados favorables obtenidos por el uso de parásitos en el laboratorio frecuentemente no pueden repetirse en el campo.

La barrera física presentada por las babosas por la capa de moco que cubre su cuerpo, la protege efectivamente de sus enemigos potenciales (Knutson et al., 1965).

De las 45 especies de invertebrados conocidas como

parásitos de moluscos solamente diez son letales a 14 especies de huéspedes (Stephenson, 1968). Godan (1983) reportó que los parásitos más importantes incluyen protozoarios, gusanos planos, carábidos y las larvas de Sciomyzidae.

A continuación se presenta una revisión de los artrópodos, nemátodos, virus, protozoarios y bacterias que se han investigado para usarlos como enemigos potenciales de los moluscos.

Insectos

Acaros

Brynetes limaceum Koch es un ácaro que comunmente se encuentra en la babosa Europea Limax maximus Linnaeus (Cooke, 1895). En Norte América el ácaro Hypopus concolor Haldeman, ha sido reportado que se ha encontrado en babosas (Bequaert, 1978).

Coleopteros

Stephenson (1965b) encontró que siete especies comunes de escarabajos, de la familia Carabidae son predadores de babosas como lo demostró en un ensayo en el que usó 20 Pterosticus melanaria (Ill.) y 20 adultos de Arion reticulatus; estos fueron puestos en un recipiente cerrado de 1 metro cuadrado y en 24 días todas las babosas habían sido comidas. Según Stephenson y Bardner (1976); encontró que 18

especies de carábidos y tres especies de staphylínidos se alimentaban de babosas; Carabus, Pterotichus y Calatus spp. fueron los predadores más importantes.

Dípteros

Tetanocera elata (Meig.) (Diptera: Sciomyzidae) aparentemente es el primer insecto conocido que se alimenta exclusivamente de babosas. Hay dos especies de Tetanocera (Foote, 1963) en Norte América y una especie de Euthycera en Europa, que se han descubierto recientemente como huéspedes específicos de babosas de la familia Limacidae.

El género Tetanocera tiene 450 especies, y ocurre principalmente en el hemisferio norte (Berg, 1963). En la naturaleza, las larvas de sciomyzidos se alimentan de unas 17 familias de gastrópodos entre ellas Arionidae y Limacidae que son babosas (Berg, 1961). Las larvas del primer estadio y parte del segundo estadio se alimentan del moco de la babosa sin matarla. Luego la larva actúa como predator, matando rápidamente a las babosas. Según Knutson et al., (1965) se puede producir de cinco generaciones de moscas durante un periodo de cinco meses.

Nemátodos

Según Chitwood (1937), citado por Bunde (1977), los moluscos y babosas en particular son conocidos como hospeder-

ros de varios nemátodos; los cuales viven en forma asexual en la cavidad del cuerpo y dejan al hospedero hasta que alcanzan su madurez sexual. Chitwood (1937), citado por Dundee (1977) encontró una incidencia de parasitismo más alta en babosas (Deroceras agrestis (Müller)) grandes (más de 25 mm de longitud) que en babosas medianas (15 a 25 mm), y que en babosas jóvenes (15 mm). Esto lo atribuye a la naturaleza del habitat. Los nemátodos observados iban de rangos de 5 a 21 cm de largo y emergían de la cabeza de la babosa.

Yaseen y Benenett (1986) mencionan que en Centro America se ha reportado el ataque del nematodo Hexameris a la babosa Sarasinula plebeia (Fisher).

Virus

Godan (1983) reportó que se conoce muy poco sobre los efectos de los virus en moluscos y expresó que desde 1960 no se ha reportado ningún artículo sobre virus en babosas.

Hongos

Godan (1983) reportó que los hongos atacan principalmente los huevos de los gastrópodos, por ejemplo, los huevos de Deroceras reticulatum (Müller). Mead (1961) menciona el hongo Verticillium chlamydeosporium Goddard, pero este hongo no tiene un uso apropiado para el control biológico, a pesar de

que tiene una alta tasa de infección en los huevos de babosas criadas en el laboratorio. Arias y Crowell (1963) encontraron el hongo del género Arthrobotrys en la babosa Arion circumscriptus Johnson.

A pesar de que las infecciones causadas por hongos son muy importantes en la cría de moluscos en el laboratorio y que pueden llegar a destruir todo el lote de crianza, en el campo los hongos pocas veces llegan a causar una eliminación total o una reducción en el número de gastrópodos (Godan, 1983).

Protozoarios

La esporozoa Klossia sp. se ha encontrado en varias babosas y caracoles, y una amoeba se ha encontrado como endoparásito de Arion rufus (L.). Lowell (1961) encontró una Acanthamoeba sp. en moluscos. Grassé (1968) listó ciliados, flagelados, coccidians y otros. Los flagelados Cryptoria helicis Leidy y Trichomonas limacis Dujardin fueron encontradas en pulmonados terrestres de importancia agrícola (Godan, 1983).

Las babosas son hospederos de un buen número de ciliados, los cuales pueden utilizarse para control biológico (Brooks, 1968). Tetrahymena limasis (Warren) y T. rostrata (Kahl), también son parásitos de babosas y están distribuidos mundialmente (Europa, USA, Sur Africa, Nueva Zelandia). Estos

parásitos infestan el hematopáncreas y las glándulas albuminas de caracoles y babosas.

Godan (1983) dijo que los parásitos tienen influencia en reducir la longevidad y fecundidad de las babosas. Las babosas que están con altas infestaciones con ciliados no ponen huevos.

Bacterias

Godan (1983) hace mención del género Pseudomonas, al cual se le atribuye como causante de la fluorescencia amarilla del moco del caracol Helix aspersa Müller (Baum y Rawls, 1972; Rawls et al., 1978). Yates y Rawls (1972) reportaron que este pigmento se debe a la presencia de la Pseudomonas la cual vive en el moco de la superficie del cuerpo, en las glándulas mucosas subepiteliales, en las aberturas del cuerpo, y en los fluidos del haemocelo y el tracto reproductivo.

Burrows (1963) reportó que las aerobacterias son patógenicas a animales de sangre fría, en los cuales producen septicemias, abscesos, alargamiento del bazo y condiciones diarréicas.

III. MATERIALES Y METODOS

La presente investigación se realizó en los laboratorios de microbiología de: la Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH), del Instituto Hondureño de Seguridad Social (IHSS), y de la Escuela Agrícola Panamericana (EAP).

Identificación del Agente Etiológico.

Crianza de las Babosas

En el Departamento de Protección Vegetal de la EAP se llevan a cabo varios estudios en el laboratorio sobre la babosa común del frijol. Uno de estos estudios estaba relacionado con el mecanismo de reproducción, específicamente con la autofecundación. Para este ensayo se utilizaron 141 babosas recolectadas en la localidad de San Juan de Linaca, Departamento de El Paraiso, las cuales se colocaron individualmente en cajas de plástico de 10.8 cm de largo por 7.6 cm de ancho por 6.0 cm de alto con tapa de plástico transparente. Se agregó tierra en la caja hasta 1 cm de altura. Se mantuvo el suelo uniformemente húmedo, aplicando agua con un rociador. Las babosas eran alimentadas día de por medio con hojas de frijol. Las babosas fueron pesadas una vez por

semana y eran manipuladas con guantes de plástico desechables, para evitar cualquier tipo de contaminación.

Después de 21 meses de crianza, algunas babosas aparecieron con lesiones y presencia de pus en la parte dorsal y posteriormente las babosas morían en el transcurso de una semana. De todas las babosas del estudio murieron 125.

De todas las babosa muertas se tomaron muestras de pus de las últimas cinco ya que en estas no se observó ninguna otra contaminación.

Aislamientos

Preparación de los Medios de Cultivos.

Se usaron medios de cultivo altamente nutritivos recomendados para favorecer el crecimiento de una amplia gama de microorganismos (Schaad, 1980; Fernandez et al., 1987). La preparación de los medios usados fué hecha siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

Agar EMB, "Eosin Methylene Blue" (Urban, 1977; USA Army, 1963; Difco manual, 1953; Gibco manual, 1983). (Anexo 1).

Agar King B (Luft, 1961; Schaad, 1980). (Anexo 2).

Gelosa Sangre con base de Casman (Fernandez et al., 1987; Difco manual, 1953; Gibco manual, 1983). (Anexo 3).

Agar MacConkey (Difco manual, 1953; Gibco manual, 1983). (Anexo 4).

Toma de Muestras

Preparación de las Babosas Muertas

Las babosas fueron lavadas cuidadosamente con agua potable, luego con agua destilada. Una vez lavadas fueron colocadas, individualmente, en platos de petri esterilizados. Esta labor fué realizada dentro de la campana de aislamiento. Posteriormente cada babosa fué desinfectada con alcohol al 70%, cerca del mechero.

Extracción del Pus

La extracción del pus se realizó por medio de una jeringa hipodérmica esterilizada de 1 cc de capacidad con una aguja # 22, la cual se introdujo en la lesión donde se observaba el pus y se realizó la succión. En algunos casos el pus era muy viscoso por lo cual se procedió a usar el asa bacteriológica de siembra, introduciéndola por el orificio hecho por la aguja de la jeringa. El asa fué esterilizada al rojo vivo en la llama del mechero antes y después de realizar cada insertación.

Inoculación de las Muestras en los Medios de Cultivo

Inoculación

Con el mechero encendido dentro de la campana de aislamiento, se tomaron cuatro muestras de pus de cada babosa. Cada una de estas muestras fueron inoculadas por duplicado en cada uno de los siguientes medios de cultivo: gelosa sangre con base de Casman, agar MacConkey, agar EMB y agar King B.

La inoculación fué hecha por el método de rayado para facilitar el aislamiento de los microorganismos que pudieran encontrarse en la muestra. Los platos de petri fueron cubiertos con papel parafina y se colocaron en la incubadora en posición invertida (Fernandez et al., 1987; USA Army manual, 1963).

Incubación

Los medios de cultivo inoculados fueron incubados a 28 C y a 37 C durante tres días. Durante el periodo de incubación los medios de cultivo fueron observados diariamente para detectar algún tipo de crecimiento.

Aislamiento de Microorganismos

De las diferentes colonias que aparecieron en los medios de cultivo se volvió a sembrar en los mismos tipos de medios de cultivo, los cuales fueron incubados en esta ocasión por 48 horas.

La operación anterior fué repetida por tres veces pero unicamente usando el medio de cultivo agar EMB. No se volvió a resembrar en vista de que el crecimiento en los platos de petri correspondía en apariencia a un mismo tipo de microorganismo.

Identificación de Microorganismos

Tinción de Gram (Modificación de Hucker)

Una vez obtenidas las colonias, se realizó la tinción de Gram modificado por Zucker (Anexo 5) (Fernandez et al., 1987).

Pruebas Bioquímicas

Los microorganismos de las diferentes colonias fueron inoculadas en los siguientes medios: agar triple azúcar hierro (TSI) (Anexo 6), agar citrato de Simmons (Anexo 7), agar urea (Anexo 8), agar lisina (Anexo 9), caldo de triptona (Anexo 10), agar hierro peptona (Anexo 11) (Fernandez et al., 1987; USA Army manual, 1963; Gibco manual, 1983).

Inoculación del Cultivo Puro en Babosas Sanas

Preparación de la Suspensión Bacterial

Se empleó el método de concentración Nefelómetro de Mc Farland como se describe en el Cuadro 1. (Lennette et al., 1985).

CUADRO 1. Método de Concentración de McFarland

Tubo de ensayo	Cloruro de Bario 1% (cm ³).	Acido Sulfurico 1% (cm ³).	Densidad aprox. de la bacteria millones/cm ³ .
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600

En la campana de aislamiento, en el área estéril creada por la llama del mechero se esterilizó el asa bacteriológica y se tomó una porción de las colonias más alejadas de los cultivos puros y se colocó en un tubo de ensayo que contenía 10 cm de agua destilada estéril. Se realizó la dilución por agitación manual de los tubos hasta obtener cierto grado de turbidez, el cual se comparó con la turbidez obtenida con las diluciones del Cuadro 1. Se usaron 300 millones de bacterias por centímetro cúbico para tener una cantidad de inóculo estándar.

Preparación de las Babosas a Inocular

Las babosas que se usaron para la inoculación fueron pesadas, lavadas con agua potable y con agua destilada estéril y colocadas individualmente en platos de petri plás-

ticos, dentro de la campana de aislamiento. Luego se desinfectó la parte dorsal con alcohol al 70%.

Infestación de las Babosas Sonas

Según los tratamientos se causaron lesiones superficiales de 0.50 cm con una pinza de punta fina, la cual era flameada antes y después de realizada la incisión. La lesión se hizo en la parte media dorsal de la babosa. La inoculación dermal se realizó introduciendo el asa bacteriológica esterilizada al rojo vivo en el mechero, dentro del tubo de ensayo que contenía la suspensión de bacterias y luego se descargaba en forma de roce continuo sobre el dorso lizo y sobre la lesión según el caso, esterilizando el asa bacteriológica antes y después de cada inoculación. El alimento se infestó utilizando 1 cm de la suspensión de bacterias teniendo el cuidado de bañar toda la lámina foliar por el haz y por el envés. El tratamiento en el que se asperja a la babosa, se realizó empleando una jeringa hipodérmica desechable de 1 cm, con una aguja # 22. Se llenaba y vaciaba en forma de rocío sobre la superficie del dorso de las babosas.

Manejo

Se colocaron las cajas de plástico en un cuarto donde se controlaron la temperatura, humedad y luz. Se tenía una temperatura promedio de 23 C, con 85 % de humedad relativa y se proporcionó 8 horas de luz usando un bombillo incandescente de 60 watts.

Se realizaron los muestreos día de por medio; las babosas eran manejadas con guantes de plástico desechables. Se les cambiaba el alimento en cada muestreo, colocando hojas tiernas y frescas de frijol. El medio se humedecía con agua destilada cada vez que se consideró necesario a fin de mantener dentro de la caja una humedad alta y constante.

Metodología Experimental

Diseño del Experimento

Se utilizó un diseño completamente al azar, con 8 tratamientos que se aplicaron a cada una de las dos bacterias utilizadas y cuatro repeticiones. Cada babosa representó una unidad experimental. Se utilizó un lote de 128 babosas, las cuales se dividieron en dos grupos de 64 babo-

sas. A cada grupo se le inoculó uno de los dos microorganismos utilizados. Los tratamientos fueron:

1. Babosa sin lesión sin inoculación (Testigo).
2. Babosa sin lesión con inoculación dermal.
3. Babosa con lesión sin inoculación.
4. Babosa con lesión con inoculación dermal.
5. Babosa sin lesión con alimento infectado con suspensión de bacterias.
6. Babosa sin lesión, asperjada con suspensión de bacterias.
7. Babosa con lesión con alimento infectado con la suspensión de bacterias.
8. Babosa con lesión asperjada con suspensión de bacterias.

Se muestreaba día de por medio y se contaba el número de babosas muertas por caja. El alimento se reponía en cada muestreo.

Se realizó análisis de varianza para saber si existía diferencias entre nivel de mortalidad obtenido con los microorganismos utilizados y entre el nivel de mortalidad entre los tratamientos aplicados.

Reaislamiento de Microorganismos de las Babosas
Inoculadas

De las babosas inoculadas que aparecieron con los síntomas de la enfermedad y murieron, se extrajeron muestras de pus de la parte media dorsal del cuerpo de la babosa y se sembraron en el medio de cultivo agar EMB. Se siguieron los procedimientos de aislamiento antes descritos para obtener cultivos puros y luego se realizaron las pruebas bioquímicas antes mencionadas para la identificación de los microorganismos aislados.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

Resultados de Laboratorio

Crecimiento de la Inoculación en los Medios de Cultivo

En todos los medios de cultivo hubo crecimiento, pero solamente en el medio de cultivo agar EMB el crecimiento fué abundante; por lo cual se decidió continuar con el proceso de aislamiento utilizando este medio y se condujo a la selección de cinco colonias que se detallan en el Cuadro 2.

En cuanto a las diferentes temperaturas utilizadas para la incubación, no hubo diferencias en tamaño ni forma de las colonias.

Resultados de la Tinción de Gram

Al observar las cinco muestras de las colonias con la ayuda del microscopio se encontraron unicamente microorganismos de tipo Gram negativo con características morfológica bacilar, de células cortas formando pequeñas cadenas.

Cuadro 2. Descripción de las Cinco Colonias de los Cultivos Puros.

Característica	Colonia				
	1	2	3	4	5
Tamaño (mm)	2.0	4.5	4.0	6.0	3.5
Forma	circular	circular	circular	circular	circular
Color	blanca	blanca	blanca	naranja	blanca
Superficie	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa
Elevación	convexa	convexa	convexa	convexa	convexa
Bordes	liso	liso	liso	liso	liso
Luz transmitida	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca
Luz reflejada	brillante	mate	brillante	brillante	brillante
Aspecto	humedo	seco	seco	humedo	humedo
Consistencia	grasosa	grasosa	grasosa	mocoide	grasosa

Pruebas Bioquímicas

Para la identificación de las bacterias se realizaron varias pruebas bioquímicas en diferentes medios, como se mencionó anteriormente. Las reacciones a cada medio se describen en el Anexo 12 y los resultados se encuentran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Reacciones de las Colonias Puras a las Pruebas Bioquímicas.

Sustratos	Colonia				
	1*	2	3	4	5*
Glucosa	-	+	+	+	-
Lactosa	-	+	-	+	-
Sacarosa	-	-	-	+	-
Acido Sulfúrico	-	+	+	-	-
Producción de Gas	-	-	-	-	-
Citrato	-	+	-	+	-
Lisina	-	-	-	+	+
Ornitina	+	+	-	+	+
Motilidad	-	+	+	+	-
Indol	-	-	+	-	-
Urea	-	-	+	-	-

A las colonias 1 y 5 tuvieron reacciones negativas en la fermentación de glucosa por lo cual se consideró como bacilos Gram negativos no fermentadores. La identificación de estos están fuera de las posibilidades de este estudio por el tiempo limitado.

Según las reacciones de los microorganismos a los diferentes sustratos se identificaron las siguientes bacterias:

- Colonia 1 Bacilos Gram negativos no fermentadores.
 Colonia 2 Citrobacter freundii (Braak 1928) Yale 1939.
 Colonia 3 Proteus vulgaris Hausser 1885.
 Colonia 4 Enterobacter aerogenes (Kruse 1896) Beijerinck 1900.
 Colonia 5 Bacilos Gram negativos no fermentadores.

De estas bacterias solamente se trabajó con el C. freundii de la colonia 2 y el bacilo Gram negativo no fermentador de la colonia 1 ya que por un error cometido se había considerado como Pseudomonas aeruginosa. Se usaron principalmente por la información obtenida en la revisión de literatura en cuanto grado de infección y debido a la escasez de babosas al realizar el estudio.

Las características generales de la bacteria identificada C. freundii, según la revisión de literatura están detalladas en el Anexo 13.

Resultados del Ensayo

La lesión causada presentó siempre la misma forma longitudinal tal como se hizo, pero las manchas que se supone que son síntomas de la enfermedad, al inicio tenían forma irregular la cual iba tomando forma alargada al pasar el tiempo y se centralizaba en la parte media dorsal de la babosa según se agudizaba la concavidad, como se describe posteriormente.

Los resultados de mortalidad por bacteria se presentan en los Cuadros 4 y 5.

De las babosas inoculadas con el bacilos Gram negativo no fermentador se obtuvieron 36 babosas muertas y 28 babosas sanas; se estimó un promedio de 35 días, desde la presencia de los primeros síntomas de la enfermedad hasta la muerte de la babosa. La mayor mortalidad se obtuvo de los tratamientos donde se le proporcionó a la babosa alimento infectado con la suspensión bacteriana y en el tratamiento donde se causó una lesión y se le proporcionó alimento infectado con suspensión bacteriana, en los cuales murieron las ocho babosas de cada tratamiento. Se encontraron seis babosas muertas del tratamiento donde se causó una lesión a la babosa y que se le inoculó con la suspensión bacteriana. De los tratamientos donde se le causó una lesión a la babosa y en el tratamiento donde se asperjó la suspensión bacteriana murieron tres babosas de cada tratamiento; y en los tratamientos donde se

inoculó a la babosa la suspensión bacterial se obtuvieron dos babosas muertas por cada tratamiento Cuadro 6.

No hubo mortalidad en el testigo ni la presencia de anomalías en el transcurso del estudio.

De las babosas inoculadas con la bacteria C. freundii se obtuvieron 22 babosas muertas, 42 sanas y se estimó un promedio de 37 días desde la presencia de los primeros síntomas de la enfermedad hasta la muerte de las babosas. La mayor mortalidad se obtuvo del tratamiento donde se le causó una lesión a las babosa y que se les proporcionó alimento infectado con la suspensión bacterial, en el que murieron cinco babosas, seguido por los tratamientos donde se les causó una lesión a las babosas y además se les inoculó con la suspensión bacterial y en el tratamiento en que se asperjó a la babosa con la suspensión bacterial. En el tratamiento donde se les proporcionó a las babosas alimento infectado con suspensión bacterial murieron tres babosas, seguido de los tratamientos donde se inoculó a las babosas con suspensión bacterial y no se les causó lesión y el tratamiento donde se asperjó a la babosa con suspensión bacterial en los cuales murieron dos babosas en cada tratamiento.

Cuadro 4. Número de Babosas Vivas y Muertas Que Fueron Inoculadas con el Bacilo Gram Negativo No Fermentador Por Tratamiento y Dias Promedios a la Muerte.

Tratamiento	# Vivas	# Muertas	Dias Promedio a la muerte
Testigo	8	0	0
Sin Lesión Inoculada	6	2	36
Con Lesión	5	3	41
Con Lesión Inoculada	2	6	39
Con Alimento Infestado	0	8	31
Asperjada con Suspensión de Bacterias	3	5	32
Con Lesión con Alimento Infestado	0	8	32
Con Lesión Asperjada con Suspensión	6	2	36
Total	30/64	34/64	35

Cuadro 5. Número de Babosas Vivas y Muertas Que Fueron Inoculadas con la Bacteria Citrobacter freundii Por Tratamiento y Días Promedios a la Muerte.

Tratamiento	# Vivas	# Muertas	Días Promedio a la muerte
Testigo	8	0	0
Sin Lesión Inoculada	6	2	39
Con Lesión	6	2	39
Con Lesión Inoculada	4	4	37
Con Alimento Infestado	5	3	35
Asperjada con Suspensión de Bacterias	6	2	39
Con Lesión con Alimento Infestado	3	5	34
Con Lesión Asperjada con Suspensión	4	4	38
Total	42/64	22/64	37

Según resultados del análisis de varianza para los microorganismos utilizados y nivel de mortalidad, no hubo diferencias significativas; lo cual indica que ambos microorganismos causan el mismo nivel de mortalidad. Pero si hubo diferencias entre los tratamientos aplicados por lo cual se realizó la prueba Duncan de separación de medias a 0.05 nivel de significancia.

En el caso de las babosas inoculadas con el bacilos Gram negativo no fermentador hubo diferencias entre: el tratamiento 5 (Babosa sin lesión que se le proporcionó alimento infectado con suspensión bacterial); con los tratamientos: 6 (Babosa sin lesión asperjada con suspensión bacterial); 3 (Babosa que se le causó una lesión y se le inoculó con suspensión bacterial); 2 (babosa sin lesión que se inoculó con suspensión bacterial); 8 (babosa con lesión asperjada con suspensión bacterial) y con el tratamiento 1 que fué el testigo. Hubo diferencias entre el tratamiento 7 (Babosa con lesión que se le proporcionó alimento infectado con suspensión bacterial) con los tratamientos 6, 3, 2, 8 y el testigo. También hubo diferencias entre el tratamiento 4 (babosa con lesión que se le inoculó con suspensión bacterial) con los tratamientos 3, 2, 8 y el testigo. Hubo diferencias entre el tratamiento 6 (babosa sin lesión con alimento infectado) con los tratamientos 2, 8, y el testigo. Y la diferencia entre el tratamiento 3 (babosa con lesión sin inoculación) con el testigo Cuadro 6.

Lo cual indica que se obtienen diferentes número de babosas muertas según la forma de inocular el microorganismo.

En el caso de las babosas inoculadas con la bacteria C. freundii hubo diferencias entre el tratamiento 7 (babosas con lesión con alimento infectado con suspensión bacteriana) con los tratamientos 3 (babosa con lesión sin inoculación de la bacteria); 2 (babosa sin lesión con inoculación con la suspensión bacteriana); 6 (babosa sin lesión asperjada con suspensión bacteriana) y el tratamiento 1 que fué el testigo. Hubo diferencias entre el testigo y los tratamientos 4 (babosa con lesión con inoculación de la bacteria); 8 (babosa con lesión asperjada con suspensión de bacterias); 5 (babosa sin lesión con alimento infectado con suspensión bacteriana).

Cuadro 7.

Cuadro 6. Resultados de la Prueba Duncan de Separación de Medias Para los Tratamientos con el Bacilo Gram Negativo No Fermentador.

Tratamiento	Medias
5	2.00 A
7	2.00 A
4	1.50 AB
6	1.25 BC
3	0.75 CD
2	0.50 DE
8	0.50 DE
1	0.00 E

Cuadro 7. Resultados de la Prueba Duncan de Separación de Medias Para los Tratamientos con la Bacteria C. freundii

Tratamiento	Medias
7	1.25 A
4	1.00 AB
8	1.00 AB
5	0.75 AB
3	0.50 BC
2	0.50 BC
6	0.50 BC
1	0.00 C

Resultados de la Identificación de los Microorganismos
Resislados de las Babosas Inoculadas

Se tomaron muestras del pus de las bacterias que se murieron despues de haber sido inoculadas con las bacterias. Siguiendo la metodologia anteriormente descrita se obtuvieron cultivos puros los cuales fueron sometidos a las mismas pruebas bioquimicas antes expuestas.

Para las babosas que fueron inoculadas con C. freundii se identificaron las siguientes bacterias:

Citrobacter freundii

Enterobacter agglomerans

Se cree que el E. agglomerans es una bacteria oportunista que tambien puede crecer cuando ya existe una infección.

Para las babosas que fueron inoculadas con el bacilo Gram negativo se identificó:

Un bacilo Gram negativo no fermentador de glucosa.

Descripción de los Síntomas Observados en las Babosas

Los primeros síntomas observables en las babosas infectadas con las dos bacterias fueron iguales y aparecían a los ocho días de inoculadas y consistían en pequeñas manchas de forma irregular cuyos tamaños promedios estaban en 2 mm de largo por 1 mm de ancho y eran de color amarillo oscuro.

A los 14 días las manchas alcanzaban un tamaño promedio de 5 mm de largo por 3 mm de ancho a lo largo del cuerpo de la babosa, de color amarillo claro, de forma cóncava y con presencia de secreciones.

A los 20 días la concavidad se agudiza y el color era blanquesino con abundantes secreciones sobre la mancha en el dorso de la babosa.

A los 25 días el tamaño de la mancha se incrementaba rápidamente hasta cubrir el 90 % del dorso de la babosa y se observa por primera vez un ligero abultamiento en el dorso.

A los 32 días el abultamiento en el dorso de la babosa es mayor y entre los 39 a 42 días las babosas con las lesiones mueren.

alfo con tupa, se colocaron en un cuarto con una temperatura promedio de 23 C, a 85 % de humedad relativa y 8 horas de luz por día.

Se realizaron muestreos cada día de por medio para saber como iba reaccionando las babosas a los tratamientos y poder posteriormente describir el proceso de la enfermedad; el estudio duró 50 días que fué el periodo en que ya las babosas habían muerto o se habían sanado.

Se realizó un análisis de varianza para cada microorganismo para determinar si habían diferencias en mortalidad y relacionando al estado de inoculación. Según resultados si hubo diferencia significativa entre los tratamientos porque parece ser que las babosas lesionadas y a las babosas que se les proporcionó alimento infectado tuvieron mayor mortalidad, las otras formas de inoculación resultaron con menores tasa de mortalidad.

Se realizó una descripción del desarrollo de los síntomas.

Se tomó una muestra de cada babosa enferma y se procedió a la identificación de los microorganismos que se encontraron para determinar si los microorganismos inoculados están relacionados con la enfermedad. De las babosas inoculadas con C. freundii se identificaron los siguientes microorganismos Citrobacter freundii, Enterobacter aerogenes que murieron como consecuencia de la enfermedad; lo cual indica que los microorganismos inoculados son los causantes de esta

- BERG, C. O. 1976. Medically important snails. In Huffacker, C. B.; Theory and practice of biological control. Univ. of California, Berkeley 1050, Albany, California. 25 p.
- BLAIR, J. E.; LENNETTE, E. H. and TRUANT, J. P. 1974. Manual of clinical microbiology. American Society of Microbiology, Washington, D. C. USA. 35 p.
- BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D.; SMITH, N. R., editores. 1957. Bergey's manual of determinative bacteriology. 7 ed. Baltimore, USA. 339 p.
- BROOKS, W. M. 1968. Tetrahymenid ciliates as parasites of the grey garden slug. *Hilgardia* 39: 205-276.
- BUCHANAN, R. E. and GIBBONS, N. E. 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8 ed. Baltimore, USA. 900 p.
- BURGES, A. 1960. Introducción a la microbiología del suelo. Editorial Acribia, Zaragoza, España. pp 148-149.
- BURDON, K. L. and WILLIAMS, R. P. 1964. Microbiology. 1 ed. Publicaciones cultural, México, D. F. México. 822 p.
- BURROWS, W. 1963. Textbook of microbiology. 18 ed. Saunders Co. Philadelphia, USA. 1155 p.
- CANTORAL, O. 1986. Evaluación de diferentes técnicas para el control de la babosa (*Veronicellidae*) en el cultivo de frijol, en San José la Arada, Chiquimula. Tesis grado de Ingeniero Agrónomo, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 42 p.
- CARRICK, R. B. 1938. The life history and development of *Agriolimax agrestis* L., the grey field slug. Transaction of the Royal Society Edinburgh. 59: 563-597.
- CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA (CENTA). 1974. Biología y control de la babosa del frijol (*Vaginulus plebeius* Fisher). El Salvador MAG - CENTA, Santa Tecla. Circular No. 96. 12 p.
- COOKE, A. H. 1895. Mollusca (Cambridge National History, III).
- CORDON, F. A. 1986. Evaluación de 14 tratamientos para el control de la babosa (Mollusca: *Veronicellidae*), en el cultivo del frijol, San Jacinto, Chiquimula. Tesis grado de Ingeniero Agrónomo, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 50 p.
- CORDOVA, W. 1981. Informe del Seminario Taller contra la babosa. Fotocopia de un reporte interno. Secretaria de Recursos Naturales, Tegucigalpa, Honduras. 18 p.

- CORTES, R. L. Y LOBO-SANAHUJA, J. F. 1980. Clinical Abdominal Angiostrongylosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29(4): 538-544.
- COTO, T. D. 1983. Combate de la babosa (Diplosolegones occidentales (Guilding) (Soleolifera; Veronicellidae) con extractos de plantas. Tesis grado de Ingeniero Agrónomo, Universidad de Costa Rica, Centro Regional del Atlántico. 53 p.
- CHICHESTER, L. F. y GETZ, L. L. 1973. The terrestrial slugs in Northeastern North America, *Sterkiana* 51: 11-42.
- CROWELL, H. H. 1967. Slug and snail control with experimental poison baits. *J. Econ. Ento.* 60: 1048-1050.
- CROWELL, H. H. 1977. Chemical control of terrestrial slugs and snails. *Agri. Exp. Station Oregon State University Corvallis.* 73 p.
- DEFIGUEJREDO, M. P. and SPLITTSTOESSER, D. F. 1976. Food microbiology: public health and spoilage aspects. The Avi Publishing Co. 492 p.
- DIFCO. 1953. DIFCO manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures. 9 ed. DIFCO laboratories. Detroit, Michigan, USA. 360 p.
- DINTHER, J. B. M. 1973. Slugs in agriculture and their control. *World Crops*, 45: 283-286.
- DUNDEE, D. S. 1977. Observations on the Veronicellids in the United States. *The Nautilus*, 91(3): 108-114.
- DUNDEE, D. S. 1977. Mermithids in introduced Mollusk. *Jour. of Parasitology*, 63 (3): 590.
- FERNANDEZ, B.; RODRIGUEZ, E. y SALGADO, E. 1987. Microbiología básica y aplicada. Manual de laboratorio. 4 ed. Universidad de Costa Rica. 154 p.
- FOOTE, B. A. 1963. Biology of slug-killing Tetanocera (Diptera: Sciomyzidae). *Proc. North Central Branch, Ent. Soc. Amer.* 18: 97.
- GATES, R. G. Y GORDON, H. O. 1975. Successional Status and the Palatability of Plants to Generalized Herbivores. *Ecology* 56: 410-418.
- GETZ, L. L. 1959. Notes of the ecology of slugs: Arion circumscriptus, Deroceras reticulatum and D. laeve. *American Midland Naturalist* 61: 485-498.

- GIBCO. 1983. Products for microbiology. Technical manual, GIBCO. 2 ed. 410 p.
- GIMMINGHAM, C. T. and NEWTON, H. C. E. 1937. A poison bait for slugs. J. Minst. Agric and Fish. 44: 242-246.
- GODAN, D. 1983. Pest slugs and snail, biology and control. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, New York. pp 288-290.
- GOULD, H. J. 1962. Trials on the control of slugs on arable fields in autumn. Plant Pathology 11: 125-130.
- GRAGG, J. B. and VINCENT, M. H. 1952. The action of metaldehyde on the slug Agriolimax reticulatus (Müller). Annal Soc Applied Biology 39: 392-406.
- GRASSE, P. P. 1968. Traité de Zoologie. tome IV: Nematelminthes, Rotifères, Gastrotriches, Kinorhynques. Masson, Paris. 10 p.
- HAIRSTONE, N. G.; WURZINGER, K. H. and BUCH, J. B. 1975. Non-chemical methods of snail control. WHO IV. BC 75. 1975. 573 WHO/Schisto/ 75: 40.
- HOWITT, J. A. y COLE, S. G. 1962. Chemical control of slugs affecting vegetables and strawberries in the pacific northwest. Jour. Econ. Entomol. 55(3): 320-325.
- HUNTER, P. J. 1966. The distribution and abundance of slugs on an arable plot in Northumberland. Journal of Animal Ecology 35: 543-557.
- HUNTER, P. J.; SYMONDS, B. V. and NEWELL, P. F. 1968. Potato leaf and stem damage by slugs. Pl. Path. 17: 161-164.
- HUNTER, P. J. and SYMONDS, B. V. 1971. The frogging slug. Nature 229: 349.
- HUNTER, P. J. and RUNHAM, N. W. 1971. Las babosas: un problema mundial. Londres. Tropical Science 13 (3): 191-197.
- JAWETZ, E.; MECNICK, J. L. y ADELBERG, E. A. 1981. Manual de microbiología médica. 9 ed. México, D. F., México. 594 p.
- JUDGE, F.D. 1972. Aspects of the Biology of the Gray Garden Slug Derogeras reticulatum MÜLLER. New York (Geneva). Agricultural Experiment Station Search Agriculture 2 (19).
- KAMINSKY, R. G.; ANDREWS, K. L. y MORAN, R. 1986. Angiostrongylus costaricensis en babosas en Honduras, Estudio Preliminar. Publicación MIPH-EAP 55. 4 p.

- KING, A. B. S. y SAUNDERS, J. L. 1984. Las plagas invetebradas de los cultivos anuales alimenticios en América Central. Administración de Desarrollo Extranjero (ODA) Londres, Inglaterra. pp 147-148.
- KNUTSON, L. V.; STEPHENSON, J. W. and BERG, C. O. 1965. Biology of a slug-killig fly, Tetanocera elata (Diptera: Sciomyzidae) Proc. Malac. Soc. Lond. 36: 213.
- LEVINE, N. D. 1970. Integrated control of snails. Amer. Zoologist. 10: 579-582.
- LENNETTE, E. H.; BALOWS, A.; HAUSLE, W. J. Jr.; SHADOMY, J. H. 1985. Manual of Clinical Microbiology. 4 ed. American Society for Microbiology. Washington, D. C. USA. pp 1095-1096.
- LOWELL, L. G. 1961. An attempt to infect mollusks with Acanthameba sp. J. Parasitology 47: 842.
- LUFT, J. H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9: 409-414.
- MALEK, E. A. 1981. Presence of Angiostrongylus costaricensis Morera y Céspedes 1971 in Colombia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 30 (1): 81-83.
- MANCIA, J. E. 1971. Combate de la babosa del frijol (Vaginulus plebeius Fisher) en El Salvador. In Reunión Anual del Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos Alimenticios, 17a Panamá, Memoria. 21 p.
- MANCIA, J. E. 1971a. La babosa (Vaginulus plebeius Fisher) nueva plaga del cultivo del frijol en El Salvador. Memorias de la XVII Reunión Anual del Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos Alimenticios. Panamá. pp 46-61.
- MANCIA, J. E. 1973. Biología y control de la babosa del frijol Vaginulus plebeius Fisher en El Salvador. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria (CENTA). Santa Tecla, El Salvador, C. A. (Circular No. 96) 12 p. (mimeografiado).
- METCALF, C. L. y FLINT, W. P. 1979. Insectos destructivos e insectos útiles, sus costumbres y su control. Décima impresión. México. CECSA. pp 1006-1007.
- MARTIN, H. 1968. Pesticide manual. British Crop Protection Council. 25 p.
- MARTIN, T. J. and FORREST, J. D. 1969. Zur Entwicklugg von Schneckenkorn Mesuroi in Groszbritannien. Pflanzen Schutz-Nachr. Bayer. 22: 212-253.

- MEAD, A. R. 1961. The giant african snail: a problem in economic malacology. Univ. of Chicago Press. Illinois, USA. 257 p.
- MEYNADIER, G.; BERGOIN, M. et VAGO, C. 1964. Bactériose épizootique chez les Hélicides (Mollusques). *Antonie van Leeuwenhoek* 30: 76-80.
- MORERA, P. y ASH, L. R. 1970. Investigación del huésped intermediario de Angiostrongylus costaricensis Morera y Céspedes, 1971. *Boletín Chileno de Parasitología* vol. 25. Jul-sept y oct-dic No. 3 y 4. Santiago, Chile. pp 134-135.
- MORERA, P. y CRISPEDES, R. 1971. Angiostrongilosis abdominal una nueva parasitosis humana. *Acta. Med. Cost.* 14: 159.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. 1987. Manejo y control de plagas de insectos. vol. 3. 1 ed. editorial Limusa. México. pp 210-217.
- NELSON, B. W. 1975. Distribution and abundance of three Arionid slug species near Ithaca. 105 p.
- NEWELL, P. F. 1967. Mollusca. In Burgess, A. y Raw, F. *Soil biology*. London Academic press. pp 413-433.
- PELCZAR, M. J. y REID, R. D. 1958. *Microbiología*. Mac Graw-Hill. México. 664 p.
- PELCZAR, M. J. Jr. y CHAN, R. C. S. 1977. *Laboratory exercises in microbiology*. 4 ed. Mc. Graw - Hill book Co. 425 p.
- PELLUET, D. Y HENDERSON, N. E. 1954. The effects of visible radiation on the ovotestid of the slug Derogeras reticulatum. *Proceedings Nova Scotian Institute Science* 23: 420-421.
- PELTIER, G. L. and LEWIS, K. H. 1966. *A laboratory manual of microbiology*. 3 ed. Macmillan Co. New York, USA. 176 p.
- PURSEGLOVE, J. W. 1968. *Tropical crops dicotyledons*, Longmans, London. 10 p.
- RAO, S. 1965. Pest of Hevea rubber. Rubber Research Institute, Kuala, Lumpur. 15 p.
- RAWLS, H. C.; BERNARDI, P. J. and WHITE, J. F. 1978. Fluorescence caused by Pseudomonas in the mucus of Helix aspersa Müller. *Sterkiana* 49: 36-37.
- RODRIGUEZ, F. 1974. Informe de labores realizadas durante el entrenamiento de Post grado en el Programa de Entomología de frijol. CIAT. 11 p.

- RUNHAM, N. W. y HUNTER, P. J. 1970. Terrestrial slugs. Hutchinson University. London. 184 p.
- RUPPEL, R. F. 1959. Effectiveness of sevin against the grey garden slug. J. ec. Ent. 52: 360.
- RUSSEL, T. y HUNTER, W. D. 1964. Physiological aspects of ecology in nonmarine mollusca. In Wilbur, K. W. y Yonge, C.M. ed. Physiology of mollusca. New York Academy Press 1: 83-126.
- SECRETARIA DE RECURSOS NATURALES. 1976. Manual para el control de la babosa. Proyecto Piloto de Maíz y Frijol. Secretaría de Recursos Naturales, Tegucigalpa, Honduras. pp 1-6.
- SIERRA, E. y MORERA, P. 1972. Angiostrongilosis abdominal. Primer caso humano encontrado en Honduras (Hospital Evangélico de Siguatepeque) Acta Med. Cost. 15: 95.
- SIMPSON, G. B. 1901. Anatomy and Fisiology of Polygyra albolabris and Limax maximus and embryology of Limax maximus. Bulletin. New York. State Museum. 8: 239-314.
- SCHAAD, N. W. 1980. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. The American Phytopathological Society, Minnesota, USA. 72 p.
- SCHWARTZ, F. H. y GALVEZ, E. 1980. Bean production problems disease, insect. Soil and climatic constraints of Phaseolus vulgaris. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 339-340.
- SMITH, B. J. 1966. Maturation of the reproductive tract of Arion ater (Pulmonata: Arionidae) Malacology 4: 325-349.
- STAINER, R. Y.; DOUDOROFF, M. and ADELBERG, E. A. 1963. The microbial world. 2 ed. Prentice - Hall, USA. 753 p.
- STEPHENSON, J. W. 1963. The biology of soil inhabiting pests. Rothamsted Experimental Station Report for 1962, Part I: 158.
- STEPHENSON, J. W. 1965b. Slug parasites and predators. Rothamsted Experimental Station Report for 1964. Part I: 187-188.
- STEPHENSON, J. W. 1967a. The molluscicidal properties of ioxinil. Rothamsted Experimental Station Report for 1966, Part I: 197-198.
- STEPHENSON, J. W. 1968. A review of the biology and ecology of slugs in agricultural importance. Proc. Malacol. Soc. London 38: 169-178.

- STEPHENSON, J. W. 1971. Suceptibility of different varieties of potato to damage by slugs. Rothamsted Experimental Station Report for 1969. Part I: 248-250.
- STEPHENSON, J. W. 1972a. Gelatin as a carrier for molluscicides. Rothamsted Experimental Station Report for 1971. Part I: 214-215.
- STEPHENSON, J. W. 1972b. Gelatin as a carrier for S - cynanoethyl N- [(methylcarbomoyl) oxy] thio-acetimidate an experimental molluscicide. Pesticide Science 3: 81-87.
- STEPHENSON, J. W. AND BARDNER, R. 1976. Slugs in Agriculture. Rothamsted Report. Part 2. pp 169-187.
- THIMANN, K. V. 1963. The life of bacteria, their growth, metabolism and relationship. 2 ed. The Macmillan Co. New York, USA. 909 p.
- THOMAS, D. C. 1948. The use of metaldehyde against slugs. Annals of Applied Biology. 35: 207-227.
- THOME, J. W. 1975. Os gêneros da familia Veronicellidae nas Américas (Mollusca: Gastropoda). Universidad Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, R. S. Icheringia Zoologia No. 48. 56 p.
- UMBREIT, W. W. 1962. Modern microbiology. Rutgers, the State University. San Francisco, USA. 506 p.
- URBAN, J. E. 1977. Laboratory manual for microbiology. Avery publishing group. Wayne, New Jersey, USA. 113 p.
- USA ARMY. 1963. Laboratory procedures in clinical bacteriology, Headquarters, department of the army technical manual. April. TM 8-227-5. 141 p.
- WAIN, R. L. 1963. 3:5-Dihalogeno - 4 - hydroxybenzonitrites: new herbicides with molluscicidal activity. Nature, London 200, 28 p.
- WEDBERG, S. E. 1965. Microbes and you. The Macmillan Co. New York. 439 p.
- WINFIELD, A. L.; WARDLOW, L. R. and SMITH, B. F. 1967. Further observations on the suceptibility of potato cultivars to slug damage. Plant Pathology 16, 136-138 pp.
- WRIGHT, C. A. 1968. Some views on biological control of trematode diseases. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 62: 320-324.

YATES, R. L. and RAWLS, H. C. 1972. The anatomical distribution of fluorescence caused by Pseudomonas in Aguispira kochi (Pfeiffer) Sierkiana 45: 14-20.

ZURIGA, S. R.; CARDONA, V. Y ALVARADO, D. 1983. Angiostrongylus abdominalis. Universidad Nacional Autónoma de Honduras. Rev. Med. Hondureña. Vol 51. pp 184-192.

Anexo 1. Agar Eosina Azul de Metileno (EMB).

Ingredientes por litro de agua desmineralizada

Peptona 190 (Digestión Pancreática de Gelatina) ...	10.0	g
Lactosa	5.0	g
Sacarosa	5.0	g
Fosfato Dipotásico	2.0	g
Eosina Y	0.4	g
Azul de Metileno	0.065	g
Agar	13.5	g

pH 0.2 a 25°C

El agar eosin de azul de metileno (EMB) es recomendado para el aislamiento selectivo y diferencial de bacilos entéricos gram negativos (Gibco manual, 1983).

Anexo 2. Agar King B (KB).

Ingredientes por litro de agua desmineralizada

Peptona Proteosa #3 (Difco)	20.0	g
K ₂ H ₂ P ₄ 3H ₂ O	1.5	g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.5	g
Agar	15.0	g
Glicerol	15.0	ml.

(Schäed, 1980).

Anexo 3. Gelosa Sangre Con Base de Casman

Ingredientes por litro de agua desmineralizada

Peptona 180 (Tejido animal - Caseína polipeptona) ...	10.0	g
Peptona 220 (Levadura - Caseína polipeptona)	10.0	g
Extracto de Carne	3.0	g
Niacinamida	0.05	g
Acido p - Aminobenzoico	0.05	g
Dextrosa	0.5	g
Almidón de Maíz	1.0	g
Agar (seco)	13.5	g

pH 7.3 0.2 a 25°C

El medio de cultivo de Casman es usado para propósitos generales en el cultivo de microorganismos fastidiosos. (Gibco manual, 1983).

Anexo 4. Agar MacConkey

Ingredientes por litro de agua desmineralizada

Peptona 190 (Digestión Pancreática de la Gelatina) ..	17.0	g
Peptona 180 (Tejido animal - Caseína polipeptona) ...	3.0	g
Lactosa	10.0	g
Sales biliares # 3	1.5	g
Cloruro de Sodio	5.0	g
Agar	13.5	g
Rojo neutro	0.03	g
Cristal violeta	0.001	g

pH 7.1 0.2 a 25°C.

El agar MacConkey es usado como un medio diferencial para el aislamiento y separación de patógenos entéricos, no fermentadores de lactosa y para organismos coliformes fermentadores (Gibco manual, 1983).

Anexo 5. Tinción de Gram Modificada por Hucker

Procedimiento

Se flamean los porta objetos en la llama del mechero para quitar capa de grasa, se dibuja por un lado un círculo y por el lado contrario se colocó una gota de agua destilada estéril, dentro del círculo marcado en el lado opuesto; de cada plato se tomó con el asa bacteriológica de siembra una porción de la colonia mas aislada y se disuelve en la gota de agua. El asa debe ser esterilizada en la llama del mechero antes y después de usarse en cada porta objeto y después de tomar cada muestra.

Se realizó el siguiente procedimiento:

Cristal violeta de Hucker y se deja por un minuto

Lavar con agua y dejar escurrir

Aplicar lugol de Hucker y dejar por un minuto

Lavar con agua y escurrir

Aplicar alcohol al 95% para decolorar y dejar por 60 segundos.

Aplicar safranina de Hucker y dejar por 10 segundos.

Lavar con agua y dejar escurrir.

(Schaad, 1980; Blair et al., 1974; Fernandez et al., 1987; Pelczar et al., 1977; Urban, 1977; Peltier et al., 1966).

Para fijar las bacterias al porta objeto se pasó este con la preparación hacia arriba ligeramente por la llama del mechero

unas cuantas veces (Fernandez et al., 1987)

Reacciones de la Tinción de Gram. (Schaad, 1980; Fernandez et al., 1987, USA Army manual, 1963)

El cristal violeta tiñe todas las bacterias no importa si estas son gram positivo o gram negativo. Al agregar el lugol se forma el compuesto iodo-cristal-violeta el cual fija el color en las bacterias, con el alcohol al 95% las bacterias que son gram negativos sueltan el color violeta (se lavan) mientras que las bacterias que son gram positivos mantienen la coloración violeta. La safranina tiñe las bacterias gram negativo de color rosado y las bacterias gram positivo continúan de color violeta.

Anexo 6. Agar Triple Azúcar Hierro

Ingredientes por litro de agua desmineralizada

Peptona 140 (Digestión Pancreática de la Caseína) ..	14.0	g
Peptona 100 (Digestión Peptica de Tejido Animal) ...	3.0	g
Extracto de Levadura	3.0	g
Dextrosa	1.0	g
Lactosa	10.0	g
Sacarosa	10.0	g
Citrato Férrico de Amonio	0.2	g
Cloruro de Sodio	5.0	g
Tiosulfato de Sodio	0.3	g
Agar	12.5	g
Rojo fenol	0.024	g

pH 7.4 0.2 a 25°C.

El agar triple azúcar de hierro es recomendado para la diferenciación de bacilos entéricos gram negativos por su habilidad de fermentar dextrosa, lactosa y sucrosa, y producción de sulfuro de hidrógeno (Gibco manual, 1983).

Anexo 7. Agar Citrato de Simmonds

Ingredientes por litro de agua desmineralizada

Citrato de Sodio	2.0	g
Cloruro de Sodio	5.0	g
Fosfato de Amonio, Monobásico	1.0	g
Fosfato Dipotasico	1.0	g
Sulfato de Magnesio	0.2	g
Agar	15.0	g
Azul de Bromotimol	0.08	g

pH 6.8 0.2 a 25°C.

El citrato de Simmonds es recomendado para el uso en la diferenciación de bacilos entéricos gram negativos (Gibco manual, 1983).

Anexo B. Agar Urea

Ingredientes por litro de agua desmineralizada

Peptona 190 (Digestión Pancreática de la Gelatina) .	1.0	g
Cloruro de Sodio	5.0	g
Dextrosa	1.0	g
Fosfato de Potasio, Monobásico	2.0	g
Urea	20.0	g
Rojo de Fenol	0.012	g
Agar	15.0	g

Usado para la determinación de microorganismos que hidrolizan la urea (Gibco manual, 1983).

Anexo 9. Agar Lisina Hierro

Ingredientes por litro de agua desmineralizada

Peptona 190 (Digestión Pancreática de la Gelatina).	5.0	g
Extracto de Levadura	3.0	g
Dextrosa	1.0	g
L - Lisina	10.0	g
Citrato Férrico de Amonio	0.5	g
Tiosulfato de Sodio	0.04	g
Agar	15.0	g
Bromocresol Púrpura	0.02	g

pH 6.7 0.2 a 25°C.

El agar lisina hierro es un medio diferencial usado para registrar la habilidad de los miembros de la familia Enterobacteriaceae para producir sulfuro de hidrogeno y la descarboxilación de la lisina (Gibco manual, 1983).

Anexo 10. Medio MIO (Movilidad Indol Ornitina)

Ingredientes por litro de agua desmineralizada

Peptona 140 (Digestión Pancreática de Caseína)	10.0	g
Peptona 190 (Digestión Pancreática de la Gelatina).	10.0	g
Extracto de Levadura	3.0	g
Dextrosa	1.0	g
Bromocresol Purple	0.02	g
Agar	2.0	g
L - Ornitina HCL	5.0	g

pH 6.5 0.2 a 25°C.

El medio MIO se ha asignado en pruebas de tubos individuales para la detección de motilidad, producción de indol y la actividad de descarboxilación de la ornitina (Gibco manual, 1983).

Anexo 11. Medio SIM

Ingredientes por litro de agua desmineralizada

Peptona 140 (Digestión Pancreática de la Caseína) ...	20.0	g
Peptona 100 (Digestión Peptica de Tejido Animal)	6.0	g
Tiosulfato de Sodio	0.3	g
Citrato Férrico de Amonio	0.2	g
Agar	3.5	g

pH 7.3 0.2 a 25°C.

El medio SIM es semisólido recomendado para el uso en la determinación de la formación de indol, producción de sulfuro y la motilidad de Enterobacteriaceae (Gibco manual 1983).

Anexo 12. Reacciones Esperadas en Cada Uno de los
Sustratos.

TSI

Sustrato de color rojizo. Permite determinar si la bacteria fermenta solo glucosa, o bien, si además puede emplear la lactosa, la sacarosa, ambas o ninguna de ellas. También es posible observar gas si se produce fermentación de los azúcares y ácido sulfídrico formado a partir del tiosulfato.

Si la bacteria es fermentadora de lactosa o sacarosa se observará una coloración amarilla en la parte superior del medio.

Si la bacteria es fermentadora de glucosa se observará una coloración amarilla en la parte inferior del medio.

Se observa producción de gas cuando se da el movimiento del medio hacia arriba por lo que queda un espacio entre el fondo del tubo de ensayo y el medio o puede también que queden espacios intermedios con burbujas.

Citrato

Sustrato de color verde. Permite determinar si la bacteria utiliza o no el citrato del sustrato que en este caso es citrato de sodio.

Si la bacteria utiliza el citrato se observará una coloración azul. La lectura se realiza en la parte superior del medio.

Urea

Sustrato color amarillo claro. La urea es fuente de nitrógeno con lo cual se diferencian bacterias patógenas y las no patógenas. Las bacterias ureasa positivas hidrolizan la urea generando dióxido de carbono y amoníaco; este último se disuelve en el medio formando hidróxido de amonio, por lo cual se eleva el pH marcadamente (el rojo de fenol toma un color rojo violeta). La lectura es positiva cuando el sustrato se tiñe de color clavellina o rojo violeta).

Lisina

Sustrato es de color morado. Permite determinar si la bacteria utiliza el aminoácido lisina.

Si las bacterias utilizan la lisina, el sustrato se observa que cambia a color amarillo, esto es debido a la descarboxilación del sustrato por lo cual el sustrato se vuelve alcalino. Cuando son bacterias que tienen un uso variable del aminoácido lisina el sustrato no queda totalmente amarillo.

MIO

Sustrato de color amarillo claro. Con este sustrato se toman tres lecturas: producción de indol, uso del aminoácido ornitina, movilidad.

Para poder realizar la lectura del indol se colocan tres 0.5 ml. del reactivo de Kovac.

Si la bacteria es productora de indol se observa la formación de un anillo rojo en la parte superior del sustrato.

Si la bacteria utiliza el amino ácido ornitina el sustrato toma una coloración amarilla.

Para obtener la lectura de movilidad se debe introducir el asa en aguja hasta el fondo y luego extraerlo por el mismo canal que se hizo al introducirla, para evitar tener una lectura de movilidad falsa. La movilidad se ve através del canal ya que se da una coloración negra.

SIM

Sustrato de color azul. Con este sustrato se toman tres lecturas: producción de ácido sulfídrico, producción de indol, movilidad.

Si la bacteria es productora de indol se observa la formación de un aro rojo, pero esta lectura se prefiere tomar del sustrato MIO. Si la bacteria es productora de ácido sulfídrico se da coloración negra.

Si la bacteria es móvil el medio se torna transparente.

(Fernandez et al., 1987).

Apexo 13. Descripción de la Bacteria C. freundii
Utilizada Para el Estudio.

Citrobacter freundii

Orden: Eubacteriales
Familia: Enterobacteriaceae
Nombre científico: Escherichia freundii (Braak 1928) Yale
1939.

Citrobacter freundii (Braak 1928) Warman and Guillen 1973.
(Breed et al., 1957).

Descripción:

Varas cortas, con terminaciones redondeadas, aparece solo, en pares o en cadenas cortas. Puede ser móvil o no.

Tipo: Gram Negativo

Temperatura:

Crece bien en medio ordinario a una temperatura que oscila entre 30 C a 37 C.

Habitat:

Normalmente se encuentra en el suelo, agua y en grado variable en los canales intestinales del hombre y otros animales. Ampliamente distribuido en la naturaleza (Breed et al., 1957). No son verdaderos gérmenes patógenos y se les considera oportunistas. Se ha encontrado citrobacter en diversas infecciones, sobre todo en las infecciones primarias de las vías urinarias y en la meningitis neumonal.

V. CONCLUSIONES

1. Los microorganismos asociados con babosas enfermas fueron identificados como bacterias del tipo Gram negativo y son: Citrobacter freundii (Braak 1928) Yale 1939; Proteus vulgaris Hausser 1885; Enterobacter aerogenes (Kruse 1896) Beijerinck 1900 y un bacilo Gram negativo no fermentador.

2. El C. freundii que se inoculó a las babosa fue el responsable de la mortalidad de las babosas pero el bacilo Gram negativo no fermentador que se identificó en el aislamiento no se está seguro que sea el mismo ya que no está descrito específicamente.

3. Los microorganismos que fueron inoculados en las babosas indujeron síntomas similares durante el período de observación.

4. Que las formas de inoculación inducen diferentes tasas de mortalidad en las babosas.

VI. RECOMENDACIONES

1. Continuar con el estudio de microorganismos asociados con la babosa que tengan el potencial para causar mortalidad, a fin de buscar la manera de controlarlas biológicamente.
2. Realizar identificaciones de la flora bacterial del tracto digestivo de la babosa para tener una idea del tipo de bacterias que se encuentren, para saber si existe alguna relación con la presencia de la enfermedad.
3. Determinar los tipos de microorganismos presentes en la superficie del cuerpo de la babosa para saber cuales son y poder asociarlos con la presencia de la enfermedad.
4. Realizar la extracción de la muestra cuando se presenten los síntomas iniciales ya que posiblemente podría encontrarse el patógeno en forma más purificada. También se puede dar el caso de que el número de especies de microorganismos presentes en esta fase sea menor por lo cual estaremos obteniendo el o los microorganismos más relacionados con la enfermedad o que sean los verdaderos causantes de la misma.
5. Se recomienda realizar la identificación completa del microorganismo Gram negativo no fermentador para conocer con certeza su género y especie y poder continuar con más seguridad en estudios futuros.

VII. RESUMEN

Se identificaron cuatro bacterias Gram negativo de las muestras de pus extraídas de babosas muertas. Las bacterias fueron: Citrobacter freundii (Braak 1928) Yale 1939; Proteus vulgaris Haussner 1885; y Enterobacter aerogenes (Kruse 1896) Beijerinck 1900 y un bacilo Gram negativo no fermentador. De estas fueron inoculadas el C. freundii y el bacilo Gram negativo no fermentador. Se usó una suspensión de 300 millones de bacterias por centímetro cúbico. Se utilizó un lote de 128 babosas, divididas en dos grupos de 64 babosas cada uno. A cada grupo se le aplicó ocho tratamientos repetidos cuatro veces, para cada microorganismo utilizado. Se usó aplicó cuatro formas de inoculación en ocho tratamientos que fueron: 1) Babosa sana, sin lesión, sin inoculación de bacteria (testigo), 2) Babosa con inoculación dermal con suspensión de la bacteria, 3) Babosa a la que se le causó una lesión, sin inoculación de la bacteria, 4) Babosa con lesión con inoculación de bacteria, 5) Babosa que recibió alimento infectado con suspensión de la bacteria, 6) Babosa sana asperjada con suspensión de bacterias, 7) Babosa con lesión y que recibió alimento infectado con suspensión de la bacterias, 8) Babosa con lesión asperjada con una suspensión de bacterias.

Las babosas fueron mantenidas individualmente en cajas de plástico de 10 cm. de largo por 6 cm de ancho por 7 cm de

enfermedad en babosas. Un bacilos Gram negativo no fermentador fue recuperado de las babosas inculadas con el bacilo Gram negativo no fermentador.

VIII. LITERATURA CITADA

- ALEXANDER, M. 1961. Introduction to soil microbiology. 2 ed. Cornell University, USA. 467 p.
- ALFORD, D. V. and UPSTONE, M. E. 1980. Pest and disease control in fruit and hop. BCPC publications, London. 669 p.
- ANDERSON, A. W. and TAYLOR, T. H. 1926. The slug pest. Yorkshire Council for Agricultural Education Bulletin No. 143, 3-14 pp.
- ANDREWS, K. L. 1985. Las babosas Veronicellidos de Centroamérica con énfasis en Sarasinula plebeia (Vaginulus plebeius). Escuela Agrícola Panamericana, Apdo. 93, El Zamorano, Honduras. 10 p.
- ANDREWS, K. L.; VALVERDE, V. H. y RAMIREZ, O. 1985. Preferencia alimenticia de la babosa Sarasinula plebeia (Fisher). Ceiba 26 (1): 59-65.
- ANONIMO. 1942. The grey field slugs Agriolimax agrestis L. and its environment. Annals of Applied Biology 29: 43-55.
- ARIAS, R. O. and CROWELL, H. H. 1963. A contribution to the biology of the grey garden slug. Bull. Calif. Acad. Sci. 62, 83-87.
- BAIN, GRAHAM, VALBER, WHITIE. 1971. Biología de los microorganismos; fundamentos de la agricultura moderna. 1 ed. editorial Aedos. Barcelona, España. pp 46-49.
- BAUM, J. M. and RAWLS, H. C. 1972. Fluorescence caused by Pseudomonas in the mucus of Anguispira kuchi (Pfeitter). Sterkians 45: 1-13.
- BARNES, H. E. y WEIL, J. W. 1944. Slugs in gardens, I. Their numbers, activities and distribution. Journal of Animal Ecology 13: 140-175.
- BARNES, H. E. y WEIL, J. W. 1945. Slugs in gardens. II. Their numbers, activities and distribution. Journal of Animal Ecology 14: 71-105.
- BEQUAERT, J. 1978. The arthropod enemies of molluska, with description of a new dipterous parasite from Brazil. Journal of Parasitology. pp 201-212.
- BERG, C. O. 1953. Sciomyzid larvae (Diptera) that feed on snails. F. Parasit. 39: 630-636.
- BERG, C. O. 1961. Biology of snail-killing Sciomyzidae (Diptera) of North America and Europe. Proc. int. Congr. Ent. XI (Vienna, 1960) 1: 197-202.