



UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS

FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AMBIENTAL

TESIS

“EVALUACION DE DIFERENTES CONCENTRACIONES (0; 60; 80 y 100) ppm DE HARINA DE SOJA (*Glycine max*) COMO INDUCTOR DE PRODUCCIÓN DE *Bacillus thuringiensis* CON FINES DE UTILIZACION COMO BIOINSECTICIDA, DISTRITO DE TARAPOTO, SAN MARTIN-2016”

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AMBIENTAL**

**PRESENTADO POR EL BACHILLER:
JOSÉ MÁXIMO DÍAZ PINTO**

**TARAPOTO – PERÚ
2016**

DEDICATORIA

A ti Señor por darme la vida y poner en mi camino a todas esas personas maravillosas que pusieron su granito de apoyo para poder culminar está investigación, a todos ellos muchas gracias.

A mi madre y padre que estuvieron alentándome con sus consejos para que no desfallezca y siga el camino correcto, por apoyarme en aquellos momentos que más lo necesitaba, durante todo el transcurso de mi vida y carrera.

A mis queridas hermanas por estar preocupándose y alentando a culminar esta investigación.

José Máximo Díaz Pinto.

AGRADECIMIENTOS

Al ICT (instituto de cultivos Tropicales) por la confianza que me depositaron al concederme poder trabajar con el *Bacillus thuringiensis*.

A la UNSM, en especial al Bach. Jean Francis Saavedra Cárdenas por apoyarme en una de las etapas más importantes de mi proyecto.

Al Mblgo. Carlos Vidaure por apoyarme con sus valiosos consejos y prestarme atención en aquellos momentos de flaqueza.

A mí querido amigo Ing. Fernando Vásquez Vásquez por alentarme y motivarme a culminar mi investigación.

A Percy Mora Pérez por apoyarme en la elaboración del corazón del proyecto que fué los biorreactores.

Al Dr. Froy Torres Delgado por facilitarme la conexión para la aplicación del programa estadístico IBM SPSS.

Al Dr. Wilson Torres Delgado por dedicarme un poco de su tiempo y vertirme conocimientos para el manejo del programa estadístico IBM SPSS.

Al Blgo. Henry Giovani Jave Concepción por apoyarme en la segunda etapa de mi tesis, explicándome como debo de realizar correctamente la producción de *Bacillus thuringiensis*.

A Erliber Castillo Facundo por apoyarme en la habilitación de los materiales e insumos a utilizar para verificar la efectividad del bioinsecticida elaborado a base de harina de soja.

Al ing. Rolando Cárdenas Soto por brindarme el tiempo y paciencia en todo el proceso de mi tesis.

INDICE

	Pag.
PORTADA.....	i
DEDICATORIA.....	.ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE.....	v
Lista de Cuadros.....	vi
Lista de Tablas.....	vii
Lista de Figuras.....	.viii
Lista de Gráficos.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	xiv
CAPITULO I: PROBLEMA	1
1.1. Planteamiento del problema.....	1
1.2. Formulación del problema de investigación.....	3
1.2.1. Problema general.....	3
1.2.2. Problemas específicos.....	3
1.3. Objetivos de la investigación.....	4
1.3.1. Objetivo General:.....	4
1.3.2. Objetivos Específicos:.....	4
1.4. Justificación de la investigación.....	5
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO	7
2.1. Antecedentes teóricos relacionados con la Investigación.....	7
2.2. Bases teóricas.....	9

2.3. Hipótesis.....	19
2.4. Definición de Términos Básicos.....	19
2.5. Identificación de Variables.....	21
2.6. Operacionalización de las variables.....	22
CAPITULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	23
3.1 Ámbito de estudio.....	23
3.2 Tipo de Investigación.....	27
3.3 Nivel de la investigación.....	27
3.4 Método de la Investigación.....	27
3.5 Diseño de investigación.....	29
3.6 Población, muestra y muestreo.....	30
3.7 Técnicas e instrumentos de Recolección de Datos.....	30
3.8 Procedimiento de Recolección de Datos.....	30
3.9 Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos.....	31
CAPITULO IV: RESULTADOS.....	32
4.1 Presentación de Resultados.....	33
4.2 Discusión.....	43
CONCLUSIONES.....	46
RECOMENDACIONES.....	47
Referencia Bibliográfica.....	48
Artículo Científico.....	50
Anexos.....	58

Lista de Cuadros

	Pag.
Cuadro 1: Diferentes cultivos e insectos que pueden ser controladas utilizando cristales producidos por <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
Cuadro 2: Composiciones en g/L de los siete compuestos más estudiados en la producción de <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
Cuadro 3: Velocidad de crecimiento del <i>Bacillus thuringiensis</i> y su tiempo de Regeneración de las 4 concentraciones de Harina de Soya Residual.....	39
Cuadro 4: Se muestra 5 valores realizadas para cada concentración patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100ppm.....	41
Cuadro 5: Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error ^a , $P < 0,05$, existen razones para decir que las varianzas sean iguales.....	42
Cuadro 6: Prueba de igualdad de efectos inter-sujetos, nivel de significación es de 0,00 por lo tanto si existen diferencias significativas.....	42
Cuadro 7: Medias marginales estimadas.....	42
Cuadro 8: Sub Conjuntos Homogéneos, Prueba Tukey.....	43

Lista de Tablas

	Pag.
Tabla 1: Operacionalización de las variables.....	.22
Tabla 2: Producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> del patrón, 60ppm, 80ppm y 100ppm	
-Primer muestreo, realizado a las 0 horas, a 400 RPM y 500 RPM.....	34
Tabla 3: Producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> del patrón, 60ppm, 80ppm y 100ppm	
-Segundo ensayo, realizado a las 4 horas, a 400 RPM y 500 RPM.....	35
Tabla 4: Resultado de la producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> del patrón, 60ppm, 80ppm y 100ppm Tercer ensayo, realizado a las 4 horas, a 400 RPM y 500 RPM.....	36
Tabla 5: Producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> del patrón, 60ppm, 80ppm y 100ppm	
-Cuarto ensayo, realizado a las 24 horas, a 400 RPM y 500 RPM.....	36
Tabla 6: Resultado de producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> promedio del patrón, 60ppm, 80ppm y 100ppm.....	37
Tabla 7: Análisis del pH, Log de recuento en RPM.....	38
Tabla 8: Valores obtenidos del pH.....	39
Tabla 9: Valores obtenidos de producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> de diferentes concentraciones de Harina de Soja residual, Patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100 ppm a 24 horas, interpretados en el programa estadístico IBM SPSS.....	41
Tabla 10: Ensayo de la efectividad del bioinsecticida a base de harina de soja a 100ppm, 200ppm y 300ppm y a 500 RPM.....	44
Tabla 11: Parámetros Evaluados para la Harina de Soja para probar la efectividad bioinsecticida.....	44

Lista de Figuras

	Pag.
Figura 1: Imagen de microscopía electrónica de transmisión de una cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i> en estado de esporangio. C: cristal paraesporal; S: espora. Barra, 0,5 mm.....	10
Figura 2: Vista de <i>Bacillus thuringiensis</i> en el microscopio de contraste de fase.....	14
Figura 3: Características geométricas de la Paleta Rushton.....	33
Figura 4: Características geométricas de la Paleta Rushton.....	33
Figura 5: Vista microscópica coloreada con la tinción de Gram.....	34

Lista de Gráficos

	Pag.
Gráfico 1: Composición nutricional de la Harina de Soja en %.....	18
Gráfico 2: Comparación de producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> -primer ensayo del Patrón, 60 ppm, 80 ppm y 100ppm, a las 0 horas.....	.35
Gráfico 3: Comparación de producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> -Segundo ensayo del Patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100 ppm.....	35
Gráfico 4: Comparación de producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> -Tercer ensayo del Patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100 ppm a las 8 horas...	36
Gráfico 5: Comparación de producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> -Cuarto ensayo del Patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100 ppm a 24 horas.....	37
Gráfico 6: Comparación de producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> -promedio del Patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100 ppm.....	37
Gráfico 7: Curva de Crecimiento de las 4 concentraciones, Patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100ppm a las 0, 4, 8, 24 horas del tiempo de recuento y a 4 horas del tiempo de fermentación, a 7.69 Log (Recuento).....	38
Gráfico 8: Evaluación del pH; obteniendo 6,18 a las 24 horas de recuento.....	40

RESUMEN

Un bioinsecticida es considerado como el producto bacteriano o actividad bacteriana que da como resultado la muerte de un insecto. Una de las formulaciones comerciales más usadas actualmente está basada en la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Esta bacteria sintetiza durante su fase de esporulación una proteína (delta-endotoxina), que muestra una actividad insecticida única. Al ser ingerido la delta-endotoxina por larvas susceptibles, afecta el intestino de los insectos causándoles la muerte. Existen endotoxinas específicas contra lepidópteros, dípteros, coleópteros.³

Este trabajo se realizó con la finalidad de evaluar diferentes concentraciones Patrón (0ppm), 60 ppm, 80ppm y 100ppm de Harina de Soja como inductor de producción de *Bacillus thuringiensis* utilizado como un Bioinsecticida. El presente trabajo de investigación busca dar alcance para producir un Bioinsecticida a bajo costo y en poco tiempo con el fin de suplir la utilización de los insecticidas que contaminan el medio ambiente.

El procedimiento aplicado fué según el protocolo para obtención de alícuotas para ensayos en biorreactores. A partir del cultivo reactivado se procedió a un escalamiento de reproducción teniendo en cuenta que el volumen de inoculación fué de 15 % del volumen de trabajo del biorreactor.¹³

De los resultados obtenidos se demostró que las cuatro concentraciones diferentes de harina de soja la que induce a la producción de *Bacillus thuringiensis* en los 4 diferentes ensayos que se realizó a las 0, 4, 8 y 24 horas del tiempo de recuento, con una velocidad de agitación de 500 RPM, ph que oscila entre los 6.18 a 7.28 a una temperatura de 30°C fué de 100ppm.

Se realizó la prueba de la efectividad del bioinsecticida a base de harina de soja en insectos larvas del orden dípteros y coleópteros a las condiciones de trabajo, ph de 6.8, densidad del agua 0.9 gr/cm³, temperatura del agua 29°C, obteniendo como resultado que el bioinsecticida a base de harina de soja mató el 90% de los insectos del orden dípteros y 99,9% al orden coleópteros, ambos en estado larvario, en periodos de 1, 8 y 24 horas de monitoreo.

La concentración que originó mayor producción de *Bacillus thuringiensis* fue de 100 ppm, obteniendo $5,0057500 \times 10^7$ UFC/ml en un tiempo de 24 horas, luego se realizaron posteriores ensayos con 200ppm y 300ppm evidenciando que la presencia de *Bacillus thuringiensis* es más notoria, por lo tanto se puede decir que si se hubiera realizado con 400ppm o 500 ppm existiría producciones más altas, se corrobora y demuestra que la harina de soja tiene eficacia insecticida y se observa que a mayor concentración de harina de soja la efectividad insecticida aumenta, si se hubiera ensayado la efectividad insecticida de la harina de soja a una concentración mayor de 500 ppm los resultados en las muerte de los insectos larvas del orden dípteros hubiera aumentado, disminuyendo el tiempo de muerte de estos insectos larva.

El presente trabajo de investigación demostró que el inductor (harina de soja) facilitó el crecimiento y producción de *Bacillus thuringiensis*, observando producciones altas de $4,3112500 \times 10^7$ UFC/ml y $5,0057500 \times 10^7$ UFC/ml de este microorganismo a las 8 y 24 horas del tiempo de recuento a una velocidad de agitación de 500RPM.

Palabras clave: Bioinsecticida, Insecticidas, Contaminación, Medio Ambiente.

ABSTRACT

A bioinsecticida is considered to be the bacterial product or bacterial activity that gives like proved the death of an insect. One of the most secondhand commercial formulations nowadays is based on the bacterium *Bacillus thuringiensis*. This bacterium synthesizes during his phase of esporulación a protein (delta - endotoxina), which shows the insecticide only activity. On the delta - endotoxina having been consumed by capable larvas, it affects the intestine of the insects they causing the death. They exist endotoxinas specific against lepidopterous, dipteral, coleópteros.³

East work was realized by the purpose of evaluating different concentrations Boss (0ppm, 60 ppm, 80ppm and 100ppm of Flour of Soybean as instigador of production of *Bacillus thuringiensis* used as a Bioinsecticida. The present work of investigation seeks to give scope to produce a Bioinsecticida to low cost and in a little time in order to replace the utilization of the insecticidas that they contaminate the environment.

The applied methodology was according to the protocol for obtaining aliquot for tests in biorreactores. From the reactivated culture one proceeded to a climbing reproduction bearing in mind that the volume of inoculation was 15 % of the volume of work of biorreactor.¹³

The obtained results there was demonstrated that four concentrations different from flour of soybean the one that it induces to the production of *Bacillus thuringiensis* in 4 different tests that were realized at 0 a.m., 4, 8 and 24 hours of the time of inventory, by a speed of agitation of 500 RPM, ph that it ranges between the 6.18 to 7.28 to a temperature of 30°C it was of 100ppm.

There realized the test of the efficiency of the bioinsecticida based on flour of soybean in insects larvas of the order dipteral and coleopterous to the conditions of work, ph of 6.8, density of the water 0.9 gr/cm³, temperature of the water 29°C, obtaining as result that the bioinsecticida based on flour of soybean killed 90 % of the dipteral insects of the order and 99,9 % to the order coleopterous, both in larval condition, in periods of 1, 8 and 24 hours of monitoring.

The concentration that originated major production of *Bacillus thuringiensis* was of 100 ppm, obtaining $5,0057500 \times 10^7$ UFC/ml in a time of 24 hours, then later tests were realized with 200ppm and 300ppm demonstrating that the presence of *Bacillus thuringiensis* is more well-known, therefore it is possible to say that if it should be realized by 400ppm or 500 ppm it would exist higher productions, there is corroborated and demonstrates that the flour of soybean has insecticide efficiency and is observed that to major concentration of flour of soybean the insecticide efficiency increases, if there had practised the insecticide efficiency of the flour of soybean to a major concentration of 500 ppm the results in the muerte of the insects larvas of the order dipteral it had increased, diminishing the time of death of these insects larva.

The present work of investigation demonstrated that the instigador (flour of soybean) facilitated the growth and production of *Bacillus thuringiensis*, observing high productions of $4,3112500 \times 10^7$ UFC/ml and $5,0057500 \times 10^7$ UFC/ml of this microorganism at 24 after 8 hours of the time of inventory to a speed of agitation of 500RPM.

Key words: Bioinsecticida, Insecticides, Pollution, Environment.

INTRODUCCIÓN

Las especies de insectos propias de un lugar que alcanzan niveles altos de daño en cultivos locales se conocen como plagas nativas, y aquellas que se originan en otro lugar geográfico, como exóticas. Los enemigos naturales también pueden ser nativos o exóticos.¹³

Un ejemplo importante de control de malezas exóticas lo representa el control de *Opuntia* spp. (Cactaceae). Esta especie nativa en el Nuevo Mundo, se convirtió en un plaga seria en los pastizales del Viejo Mundo y Australia, donde el clima y la ausencia de herbívoros favoreció su dispersión y abundancia. Esta maleza se ha controlado en muchos países mediante la introducción de insectos benéficos (fitófagos), como *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera pyralidae).¹³

Una especie de enemigo natural puede resultar para controlar la plaga en una parte del área y otro agente puede ser más importante en otra área. Por ejemplo, la introducción de la avispa parasitoide *Aphytis melinus* (Hymenoptera: Aphelinidae) es el principal agente controlador de la escama roja *Aonidiella aurantii* (Homoptera: Diaspididae) en las condiciones más extremas de clima.¹³

En el cultivo de la papa, tanto la planta como los tubérculos son infestados por diversos insectos que destruyen la planta, durante su permanencia en el campo, y el tubérculo, una vez cosechado. A su vez, hongos como *Beauveria* spp., *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* y *Paecilomyces* spp., son comunes en el campo. Estos hongos tienen un amplio rango de hospedantes y han sido utilizados para controlar diversas plagas en diferentes lugares. En el Perú se ha trabajado en programas para el control del gorgojo de los Andes principalmente. También se han controlado nematodos utilizando *Paecilomyces lilacinus*.¹⁴

El control de plagas que afectan a los cultivos agrícolas es uno de los problemas de contaminación ambiental más severos para nuestro recurso agua, suelo y aire, la utilización de insecticidas está ocasionando desequilibrios en nuestros ecosistemas. Recientemente se ha dado un gran impulso al uso de microorganismos en el control de plagas, debido a que el uso indiscriminado de los insecticidas ha

ocasionado la contaminación de la gran mayoría de nuestros recursos naturales. El control Biológico de plagas puede especificar como el uso de organismos naturales: Virus, bacterias, hongos, protozoarios y nemátodos, para el exterminio de insectos que afectan los cultivos. Existen aproximadamente más de 1500 microorganismos o metabolitos microbianos que poseen propiedades insecticidas. El potencial del uso de estos organismos se debe a su alta especificidad, es decir que afectan sólo a los insectos y no causan daño al medio ambiente.¹²

Bacillus thuringiensis, es un habitante normal del suelo, es un componente importante en el control biológico. Es una bacteria Gram positivo, que se caracteriza por la producción de varias proteínas con capacidad insecticida al ser ingerido por larvas susceptibles específicamente orden lepidóptero, coleóptera y diptera.³

Actualmente existen varios productos comerciales a base de *Bacillus thuringiensis* cuyo ingrediente activo insecticida es una proteína llamada deltaendotoxina, liberada durante la esporulación. Las deltaendotoxinas actúan sobre las microvellosidades del epitelio intestinal de larvas susceptibles, causándoles la muerte del insecto. El *Bacillus thuringiensis* es una buena alternativa debido a que es inocuo al hombre, animales domésticos, flora y fauna silvestre; es específico al estado larvario de lepidópteros, coleópteros y algunos dípteros perjudiciales, por último los costos de producción lo hace competitivo debido a los avances tecnológicos frente a los insecticidas químicos.¹⁵

La fermentación de *B. thuringiensis* se lleva a cabo normalmente a una temperatura entre 27°C y 33°C, siendo la temperatura óptima de 30°C. A 45° C se produce una disminución en la producción de este organismo. Es esencial una fuente inductor para la producción de este microorganismo, la literatura reporta que la Harina de Soya es la fuente preferida para el *B.t* debido a que ésta contiene 40% de proteínas.⁴

El presente proyecto de investigación consistió en evaluar la producción del *Bacillus thuringiensis* de cuatro concentraciones diferentes de Harina de Soja, para el patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100ppm, teniendo en cuenta los parámetros de temperatura, velocidad de agitación y pH, para seguidamente probar la efectividad del

microorganismo como bioinsecticida en dos grupos de insectos de orden dípteros y coleópteros.

CAPITULO I: PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema.

Los insecticidas utilizados para maximizar los rendimientos de cosecha y mejorar la calidad edafológica poseen una marcada incidencia ambiental. Estos compuestos, según su efectividad particular se utilizan para combatir las malezas y las enfermedades fungosas respectivamente. Estos compuestos tóxicos ocasionan efectos adversos para el medio ambiente (aire, agua y suelo).³

En la Región San Martín, Provincia de San Martín, Distrito de Tarapoto, los insecticidas son utilizadas para combatir y eliminar plagas tales como, la Broca de Café (*Hypotenemus hampei*), la mosca de la fruta (*Anastrepha* spp), pentastomídeos fitófagos en Cacao y palma aceitera, el chinche del Cacao (*Linchus* sp y *Pantotelmes* sp.), el gusano cogollero en arroz y maíz (*Spodoptera* sp.), barrenos de los tallos de arroz, maíz y caña (*Diatraea* sp.), y otros insectos de importancia secundaria, estos artrópodos del orden lepidópteros (mariposas y polillas) son las causantes de enfermedades en los vegetales, esencialmente del tipo granos (maíz, arroz, café, cacao, palma, etc.), es a consecuencia de ello la utilización de estos compuestos químicos sintéticos (insecticidas). Estos insectos atacan al tallo o estirpe de los cultivos, el perjuicio que causa en la planta se concreta en la pérdida de su capacidad de producción, en su total destrucción, o en la inutilización de los órganos.⁶

Los bioinsecticidas en el país carecen de información en el campo ambiental, manteniéndose en forma limitada para algunos cultivos (algodón, manzano, cítricos y caña de azúcar y otros más, como los productos de agro exportación (Alcachofa, esparrago, etc.).⁶

Los controladores biológicos existen de forma natural en el ambiente, asociados a los insectos que afectan de manera negativa a los diversos cultivos, las poblaciones de los controladores biológicos son mucho menos numerosas que los insectos plaga, es lo que les resta eficiencia en ser

controladores naturales, pues son los más afectados cuando se aplican insecticidas, las investigaciones en ésta área están muy limitadas, entre otros factores por la escasa presencia de investigadores en este rubro y en esta zona del distrito de Tarapoto.⁶

Existen controladores biológicos Virus, bacterias, hongos, protozoarios y nemátodos. Una variedad de hongo del género *Beauveria* es muy conocido como entomopatógeno, siendo esta capaz de controlar diversas plagas de insectos. Las bacterias endofíticas forman parte de la gran cantidad de bacterias benéficas presentes en la rizósfera, que favorecen el crecimiento y desarrollo de las plantas y las protegen contra otros organismos del suelo que causan enfermedades, especialmente al nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorn, a esta relación benéfica entre las bacterias y las plantas se le denomina “mutualismo”, el cual se define como la condición en la que dos seres vivos de diversas especies viven juntos habitualmente.¹⁶

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram-Positiva, aerobia estricta, que durante su ciclo de vida presenta dos fases principales: crecimiento vegetativo, donde las bacterias se duplican por bipartición, y esporulación, un programa de diferenciación de bacteria a espora. La producción de bioinsecticidas basados en *Bacillus thuringiensis* se realiza comercialmente por fermentación sumergida, bajo condiciones controladas que aseguren calidad y competitividad al producto, siendo una bacteria utilizada como bioinsecticida, reduciendo los impactos ambientales.⁴

Este bioinsecticida es considerado como el producto bacteriano o actividad bacteriana que da como resultado la muerte de un insecto. Una de las formulaciones comerciales más usadas actualmente está basada en la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Esta bacteria sintetiza durante su fase de esporulación una proteína (delta-endotoxina), que muestra una actividad insecticida única. Al ser ingerido la delta-endotoxina, por larvas susceptibles, afecta el intestino de los insectos causándoles la muerte. Existen endotoxinas específicas contra

lepidópteros, dípteros, coleópteros y recientemente nuevas proteínas que han sido aisladas contra nemátodos y protozoarios.⁴

Existen diversos medios de cultivos que permiten la producción masiva de *Bacillus thuringiensis*, siendo estos la melaza de maíz, puré de tomate, harina de soja, espárrago, harina de pescado, extracto de levadura y sanguaza.¹⁵

La harina de soja es un excelente inductor de producción de *Bacillus thuringiensis*, ya que en su valor nutricional esta posee el 40 % de proteínas, siendo éste el requerimiento esencial para la reproducción de esta mencionada bacteria.¹⁷

La producción de *Bacillus thuringiensis* utilizado como bioinsecticida carece de un amplio conocimiento en el campo ambiental, a través del presente proyecto de investigación se pretende dar alcance de la reproducción de este microorganismo mediante la harina de soja a diferentes concentraciones, y a través de ello paliar la utilización de estos insecticidas, con ello se estará contribuyendo a minimizar/reducir los impactos ambientales negativos ocasionados por los insecticidas.¹⁵

1.2. Formulación del problema de investigación.

1.2.1. Problema general.

- ¿Cuál de las diferentes concentraciones (0; 60; 80 y 100) ppm de harina de soja (*Glycine max*) resultará ser el inductor de producción de *Bacillus thuringiensis* con fines de utilización como bioinsecticida?.

1.2.2. Problemas específicos.

- ¿Facilitará el inductor (harina de soja) en el crecimiento y producción de *Bacillus thuringiensis* con fines de utilización como bioinsecticida?

- ¿Cuál será la influencia de las variables como temperatura y pH en la producción de *Bacillus thuringiensis* con fines de utilización como bioinsecticida?.
- ¿Cuál será el tiempo mínimo para la producción de *Bacillus thuringiensis* teniendo en cuenta la curva de consumo del inductor?.
- ¿Cuál será la efectividad del bioinsecticida a base de harina de soja con la que mejor indujo a la producción de *Bacillus thuringiensis*.

1.3. Objetivos de la investigación.

1.3.1. Objetivo General.

- Evaluar las diferentes concentraciones (0; 60; 80 y 100) ppm de harina de soja (*Glycine max*) resulte ser el inductor de producción de *Bacillus thuringiensis* con fines de utilización como bioinsecticida.

1.3.2. Objetivos Específicos.

- Evaluar el inductor (harina de soja) en el crecimiento y producción de *Bacillus thuringiensis* con fines de utilización como bioinsecticida.
- Evaluar la influencia de las variables como temperatura y pH en la producción de *Bacillus thuringiensis* con fines de utilización como bioinsecticida.
- Determinar el tiempo mínimo para la producción de *Bacillus thuringiensis* teniendo en cuenta la curva de consumo del inductor.
- Comprobar la efectividad del bioinsecticida a base de harina de soja con la que mejor indujo a la producción de *Bacillus thuringiensis*.

1.4. Justificación de la investigación.

En la Región, Provincia de San Martín, distrito de Tarapoto la utilización de insecticidas son destinados a combatir plagas de insectos que afectan directa o indirectamente los cultivos, esta utilización de insecticidas está ocasionando efectos negativos considerables al medio ambiente, durante mucho tiempo, los insecticidas son utilizados para el control de insectos plaga, han sido denominados de segunda generación, el abuso de ellos, ha llegado a causar graves daños al aire, agua y suelo.³

Entre los principales problemas ambientales que causa el uso excesivo de estos insecticidas son la contaminación en los mantos freáticos, contaminación de ríos, quebradas, lagunas, perturbación de ecosistemas acuáticos, degradación de los suelos, bioacumulación y biomagnificación en las especies acuáticas, terrestres y aéreas, emisiones a la atmósfera de compuestos nitrogenados, por tanto, pérdida de biodiversidad, efectos tóxicos en animales y el hombre.³

Los problemas ambientales causados por el uso excesivo de insecticidas obligan a buscar nuevas alternativas de manejo de insectos plaga, existen diferentes alternativas a los métodos químicos, como por ejemplo el uso de bioinsecticidas. Existen bioinsecticidas elaborados a base de melaza de maíz, puré de tomate, esparrago, harina de pescado, harina de soja siendo capaces de controlar y eliminar insectos plaga; al mismo tiempo existen organismos capaces de controlar naturalmente a las plagas que afectan a los cultivos, entre los cuales se encuentran las bacterias, nemátodos, hongos, entre otros. La falta de estudios sobre este importante tema es falente en nuestro país, región y en especial en el distrito de Tarapoto; los insecticidas provocan serios problemas ambientales que alteran el equilibrio ecológico; la finalidad es resaltante, es utilizar un producto accesible, económicamente rentable y amigable ambientalmente que facilite la producción del mencionado organismo aplicado para el control de insectos plaga. El *Bacillus thuringiensis* es considerada una bacteria ubicua, ya que se ha aislado de todas partes del mundo y de muy

diferentes sistemas, como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, etc; el *Bacillus thuringiensis* libera una proteína denominada cristal proteínico, que esta elimina o mata al insecto en estado larvario. ¹⁴

El cristal proteínico está constituido por proteínas denominadas δ -endotoxinas también conocidas como proteínas Cry o Cyt. Se han encontrado δ -endotoxinas activas contra insectos lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros y también contra otros invertebrados como nemátodos, gusanos planos y protozoarios.² Cuando el cristal es ingerido por un insecto susceptible en fase larvaria llega a su intestino medio, se disuelve por la acción de los jugos intestinales a pH alcalino, aquí la δ -endotoxina sufre una proteólisis enzimática y da origen a la toxina activa, la cual se une a un receptor específico de las membranas epiteliales de las células del intestino, lo que genera poros que desequilibran su balance osmótico y provocan la lisis celular de esta parte del aparato digestivo, posteriormente causa diarrea y vómitos en el insecto, lo que puede provocar eventualmente su muerte por una deshidratación severa.¹¹

La Harina de soja se caracteriza por su alto contenido en proteínas de origen vegetal, ocupa una posición intermedia entre las legumbres y los granos oleaginosos debido a que contiene más proteínas (40%) que las demás legumbres pero menos grasas (21%) que las demás semillas oleaginosas, las proteínas constituyen un alimento de elevado valor nutritivo, siendo el requerimiento nutricional primordial en la reproducción del *Bacillus thuringiensis*.¹⁷

El bioinsecticida producido a partir del *Bacillus thuringiensis* carece de un amplio conocimiento en el campo ambiental, por ende el presente trabajo de investigación pretende brindar conocimientos sobre la producción de este microorganismo utilizando la harina de soja a diferentes concentraciones, la importancia de esta investigación es la de reducir, minimizar, desplazar la utilización de estos insecticidas químicos, ya que estos ocasionan impactos negativos al Medio Ambiente.

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO.

2.1. Antecedentes teóricos relacionados con la Investigación.

Según *Beltrán L. et al* (2012) “Estrategia para el diseño de un medio de cultivo para la fermentación con *Bacillus*”. El estudio del medio de cultivo para la fermentación con *Bacillus thuringiensis* tendiente a la producción del ingrediente activo de un biopesticida que emplea cepas nativas de esta bacteria. Se realizaron fermentaciones en matraz de 1000 mL de volumen total con 100 mL de volumen de fermentación, utilizando 10 mL de inóculo bacteriano, una temperatura de 29°C y una velocidad de agitación de 200 revoluciones por minuto (rpm). El estudio se realizó empleando un modelo de diseño experimental con glucosa como fuente de carbono evaluando la concentración de las fuentes de minerales en el medio de cultivo para la cepa. También se evaluó la relación óptima entre el nitrógeno orgánico y el nitrógeno inorgánico en el medio de cultivo, para la producción de la proteína asociada al cristal para la cepa nativa Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN).¹

Según *Cerdán* (2011) “Producción de biomasa de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* mutante en un medio fermentativo a base de sanguaza”. La utilización de la sanguaza constituye una alternativa de tecnología limpia de los ambientes pesqueros, pues una tonelada métrica de pescado procesado produce 50 litros de sanguaza y a nivel nacional se han generado más de 500 millones de litros, representando un verdadero problema en las costas del Perú. Por lo tanto, su uso como medio de producción de *Bacillus thuringiensis* evitaría la contaminación de puertos, disminuyendo los costos de producción e incrementando el rendimiento de la Bacteria.²

De acuerdo a *Cabrera* (2009) “Control biológico evaluación de cepas de *Bacillus thuringiensis*”. El primer paso para el ensayo biológico se basó en obtener individuos adultos de *D. melanogaster* Meingen de la propia zona de trabajo. El método consistió en ofrecer un medio de puesta de huevos a las moscas salvajes, y con esto se dispuso de individuos adultos listos para elaborar los cultivos caseros. El medio de puesta consistió en tomar unos trozos

de tomates bien maduros macerados. El olor avinagrado que produjo la fermentación resultó un poderoso atrayente para estos insectos. Se cubrió el fondo de unos recipientes plásticos con el alimento y se colocaron en un lugar cercano soleado durante dos o tres días, hasta que la multitud de estos insectos poblaron los alrededores del recipiente y comenzaron a depositar los huevos sobre la pasta de tomates maduros fermentados. Una vez que la pasta se pobló de larvas se retiraron para establecer la cría. Los ensayos se hicieron con 20 larvas por cepa a probar. Se realizaron tres repeticiones con tres réplicas cada una. En una placa de Petri con medio nutriente que contenía un cultivo totalmente esporulado y cristalífero de la bacteria se colocaron 20 larvas, se sellaron con parafilm y se incubaron a 25°C.³

Según Escobar (2004) "Análisis exploratorio para la optimización de un medio de cultivo para la fermentación de *Bacillus thuringiensis*". La harina de soya es un sustrato complejo que contiene la mayoría de los nutrientes que requiere la bacteria para su crecimiento y desarrollo. Al comparar el comportamiento de la variable Peso Seco, en relación con los componentes del medio de cultivo, se aprecia que este componente harina de soya, es el que presenta mayor velocidad de asimilación por parte del microorganismo. El jarabe de maíz es muy rico en nitrógeno y factores de crecimiento, sin embargo, sus componentes se asimilan a menor velocidad que la harina de soya.⁴

Según Moreno (2005). "Aislamiento de *B. thuringiensis* HD-1 var. *Kurstaki*, en un medio de dextrosa cinco gramos, extracto de levadura dos gramos y harina de soya, un gramo por litro de agua destilada, con ello se obtuvieron altos niveles de producción de delta-endotoxina. En 3 especies de *B. thuringiensis* una de la variedad *alesti* y dos de la variedad *kurstaki*, se observó que la producción de delta-endotoxina y la actividad insecticida varía aumentando su efectividad insecticida.¹⁸

2.2. Bases teóricas.

Bacillus thuringiensis es una bacteria cosmopolita que puede ser aislada fácilmente a partir de muestras de suelo y otros muchos substratos. Su característica más importante es la capacidad de producir proteínas con toxicidad específica para insectos de las que actualmente se conocen más de 250 holotipos. Es el microorganismo entomopatógeno más utilizado como bioinsecticida en el control de insectos y ha dado lugar a la selección de algunos biotipos resistentes en condiciones de campo. La identificación y caracterización de nuevas proteínas Cry de *B. thuringiensis* es de interés ya que puede contribuir, por un lado a reducir la utilización de los agroquímicos, y a mejorar la calidad ambiental de un ecosistema.⁵

Origen de *Bacillus thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis fue aislado por primera vez en Japón por Ishiwata en 1901 como patógeno del gusano de seda, *Bombyx mori* (*Lepidoptera, bombycidae*), causándole la enfermedad de Sotó. En 1911 en Berliner, en Alemania aisló la misma bacteria a partir de la harina del lepidóptero *Anagasta kuehniella* (*Lepidoptera, Pyralidae*), la palomilla de la harina del Mediterráneo, e hizo una descripción de la forma de esta bacteria: Bacilo Gran Positivo, que presenta un cristal paresporal de naturaleza proteica, endoespora y flagelos peritricos, en distintas fases de su ciclo de crecimiento. La denominó *Bacillus thuringiensis*, en honor a la región alemana de donde la aisló (Thuringia).⁶

Características generales del *Bacillus thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis es un bacilo Gram positivo, de flagelación peritrica, que mide de 3 a 5 μm de largo por 1 a 1,2 μm de ancho y que posee la característica de desarrollar esporas de resistencia elipsoidales que no provocan el hinchamiento del perfil bacilar, ver Figura 1, microorganismo anaerobio facultativo, quimioorganótrofo y con actividad de catalasa. Los distintos aislamientos de *Bacillus thuringiensis* presentan en general características bioquímicas comunes, la característica principal de *Bacillus*

thuringiensis es que durante el proceso de esporulación produce una inclusión paraesporal formada por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica que son tóxicos para distintos invertebrados, especialmente larvas de insectos. Estas proteínas se llaman Cry (Cristal) y constituyen la base del insecticida biológico más difundido a nivel mundial.⁷

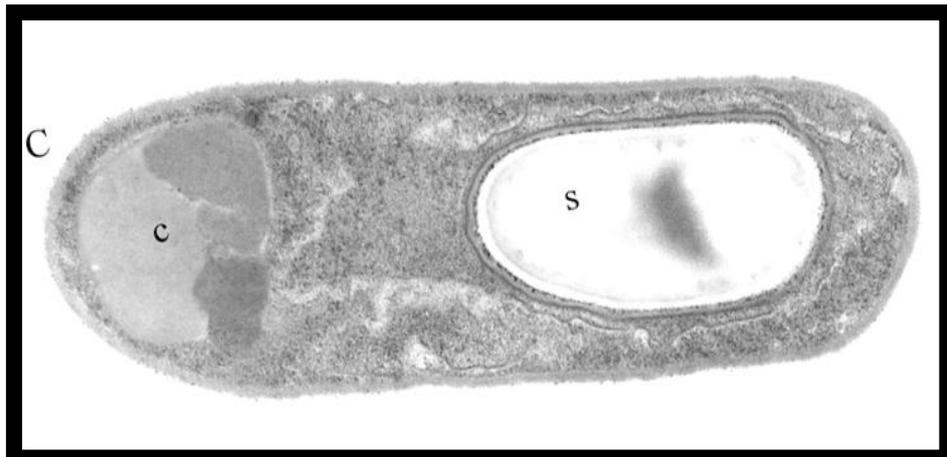


Figura 1: Imagen de microscopía electrónica de transmisión de una cepa de *B. thuringiensis* en estado de esporangio. C: cristal paraesporal; S: espora. Barra, 0,5 μ m. Fuente: Revista Argentina de Microbiología, 2008.

Mecanismo de Acción.

Bacillus thuringiensis tiene un ciclo de vida que comprende la formación de endoespora cuando las condiciones del medio en el que se encuentran son adversas. La endoespora es una forma de resistencia frente a situaciones de estrés ambiental como la desecación o la falta de nutrientes, entre otros. Junto con la endoespora también forma un cristal paraesporal constituido por d-endotoxina. Cuando estas protoxina contenidas en el cristal son ingeridas por larvas de los insectos susceptibles les causan intoxicación. Las condiciones alcalinas del intestino medio de las larvas y sus enzimas digestivas (principalmente tripsina y quimotripsina) disuelven los cristales y activan las protoenzimas por cortes proteolíticos, convirtiéndolos en toxinas. La toxina es reconocida por receptores de membrana de las células epiteliales del intestino medio del insecto, se ancla a ella y forma canales iónicos, causando un desequilibrio osmótico y por tanto la lisis celular. Esto provoca en último término

la muerte del insecto. Las endosporas de *Bacillus thuringiensis* se mantienen en el canal alimentario, donde, después de una disminución del pH provocada por el desequilibrio osmótico, pueden germinar.⁸

Una característica importante de estas toxinas es el grado de especificidad. En la relación toxina-insecto susceptible se han descrito cuatro niveles de especificidad. El primer nivel corresponde a la conducta alimentaria del insecto, éste debe ingerir junto con su alimento las endosporas y los cristales de *Bacillus thuringiensis*. El segundo nivel viene definido por el pH del intestino medio del insecto, que debe ser alcalino, pues la mayoría de los cristales paresporales de *Bacillus thuringiensis* se solubilizan a pH alto, excepto en un caso, en el que también solubilizan a pH ácido. El tercer nivel es debido a las proteasas alcalinas del intestino del insecto; éstas son las adecuadas para poder digerir parcialmente las proteínas, es decir, realizar el paso de protoxina a toxina. Por último, el cuarto nivel de especificidad corresponde a los receptores de membrana de las células epiteliales del intestino medio del insecto; las toxinas deben ser reconocidas por los receptores para poder anclarse a la membrana.⁸

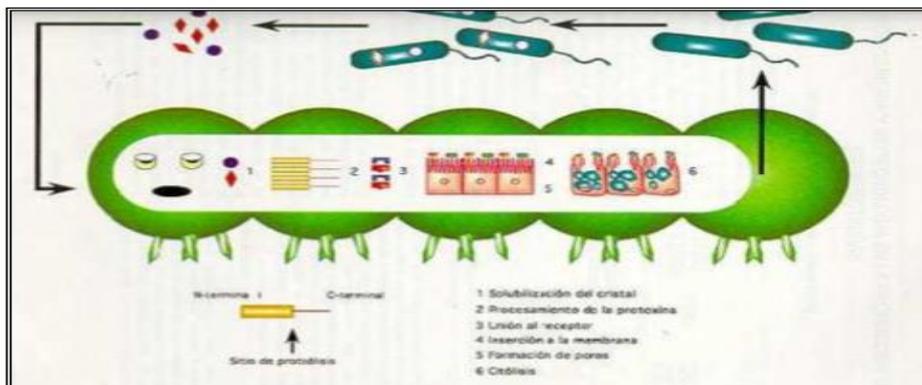


Imagen 1: Mecanismo de acción de *Bacillus thuringiensis*.

Fuente: http://www.bioteconolocus.com/articulos/bt/default.htm#_Introducción,2009.

Importancia de *Bacillus Thuringiensis*.

El microorganismo más utilizado como bioinsecticida y extendido comercialmente en todo el mundo es *Bacillus thuringiensis* es la bacteria entomopatógena más ampliamente utilizada como Bioinsecticida, solo o en

combinación con pesticidas químicos, su importancia radica en su toxicidad contra larvas de insectos-larva. Preparaciones realizadas en base a *Bacillus thuringiensis* han sido utilizadas como insecticidas orgánicos o bioinsecticidas desde fines de la década de los 30. En la actualidad se conocen más de 100 formulaciones en el mercado mundial, aplicándose alrededor de 10.000 toneladas anualmente en el planeta, siendo Dipel la marca más utilizada.^{6,6}

Los insecticidas son sustancias o mezcla de sustancias de origen natural o sintético destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier insecto, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otros insectos en o sobre sus cuerpos.⁹

Los productos de este microorganismo presentan algunas características importantes como la usencia de toxicidad en los seres humanos, en otros vertebrados y en las plantas, así como un espectro de acción reducido, lo que indica que puede ser altamente específico para algún insecto determinado; por tanto estos bioinsecticidas pueden ser particularmente dirigidos para combatir a un insecto de interés sin perjudicar ni dañar el medio ambiente.⁹

PLANTA O CULTIVO	INSECTOS
<i>Spinacia oleracea, Brassica campestris, Brassica oleracea, Lactuca sativa, Solanum tuberosum.</i>	<i>Pieris brassicae, Pieris rapae</i>
<i>Citrillus vulgaris</i>	<i>Spodoptera exigua</i>
<i>Nicotiana tabacum, Gossypium herbaceum.</i>	<i>Heliothis zea, Heliothis virescens</i>
<i>Hyperium perforatum</i>	<i>Colias lesbia</i>
<i>Musa ssp.</i>	<i>Oeketicus sp., Phorbetron spp, Oeketicus sp, Sibine sp</i>

Cuadro 1: Diferentes cultivos e insectos que pueden ser controladas utilizando cristales producidos por *Bacillus thuringiensis*.

Aislamiento e Identificación de *Bacillus thuringiensis*.

El aislamiento y selección de nuevas cepas de la especie *Bacillus thuringiensis*, utilizada para la producción de bioplaguicidas es una práctica internacional que ha permitido aumentar las posibilidades de uso a partir de nuevas cepas con potencialidades de control sobre otros organismos que constituyen plagas.¹⁰

La mayoría de los procedimientos para el aislamiento de *Bacillus* con actividad entomopatógena, incluyen un pre-tratamiento de pasteurización de las muestras destinado a la eliminación de la flora vegetativa presente en la misma sin afectar la viabilidad de la mayoría de las esporas, siendo ésta la primera etapa electiva del proceso.⁵

El tratamiento con calor consiste en calentar a una temperatura entre (60-65) °C, las suspensiones de la muestra en solución salina o en agua corriente durante 60 min. *Bacillus thuringiensis* se distingue solamente por la formación de cuerpos paresporales visibles al microscopio. Se corroborará la presencia de la especie thuringiensis mediante la determinación de la presencia del cuerpo paraesporal o cristal.¹⁰

La tinción de Gram es un tipo de tinción empleado en microbiología para la visualización de bacterias. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose Bacteria Gram positiva a las bacterias que se visualizan de color violeta y Bacteria Gram negativa a las que se visualizan de color rosa.¹¹

La presencia de cristal paraesporal es la característica más importante para la identificación de *Bacillus thuringiensis*, se determinan por tinción, es decir se preparan frotis delgado de la solución de *Bacillus thuringiensis* sobre un vidrio portaobjeto, secándolo a temperatura ambiente y luego, exponiéndolo suavemente a la llama del mechero. El material fijado se cubre con una solución de cristal violeta 0.5% durante 2-3 min. Se lava el exceso de

colorante con agua y se deja secar el frotis a temperatura ambiente. Los cuerpos paresporales se observan al microscopio óptico con 100x de aumento.¹¹

El Cristal Paraesporal.

El cristal paraesporal se ubica en el interior del esporangio, generalmente, fuera del exosporio, sin embargo se han descrito cristales paresporales dentro del exosporio en algunos aislamientos, con lo que el cristal y espora continúan juntos tras la lisis celular. Al igual que la espora existen pruebas de que los cristales son activados por acción de la luz ultravioleta siendo además fácilmente degradado por la acción de los microorganismos del suelo. Una vez completada la esporulación, se produce la lisis de la pared de esporangio, liberándose el cristal y la espora en el medio, comenzando el ciclo de nuevo, si las condiciones son favorables.¹¹

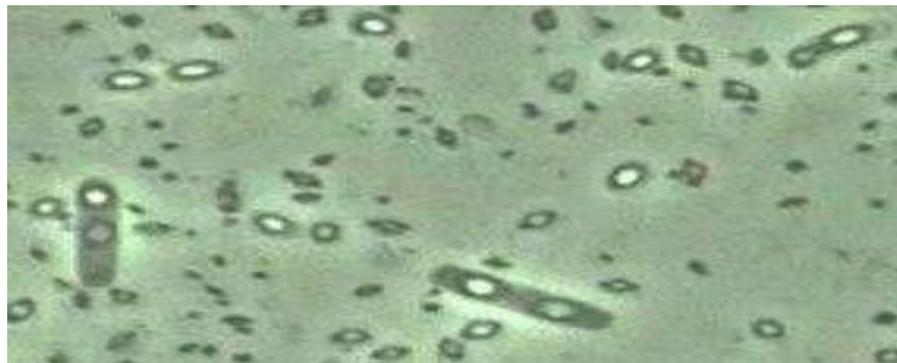


Figura 2: Vista de *Bacillus thuringiensis* en el microscopio de contraste de fase.

Fuente: http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs00_01/custodio/Bt_general.html (8).

Nutrientes que requieren los Microorganismos.¹¹

El aislamiento de bacterias a partir de muestras naturales se realiza, en la mayoría de los casos, mediante la producción de colonias aisladas en cultivos sólidos. El crecimiento explosivo de las bacterias produce un gran número a partir de una única célula inicial de forma que tras un periodo de tiempo de incubación en las condiciones ambientales adecuadas, se produce una colonia de individuos iguales. Para crecer, un microorganismo necesita nutrientes que le aporten energía y elementos químicos para la síntesis de sus

constituyentes celulares. Dependiendo de la fuente de carbono que utilizan, los microorganismos se pueden clasificar en:

- Autótrofos: si es el CO₂ atmosférico (microorganismos que fotosintetizan).
- Heterótrofos: si utilizan carbono orgánico.

Medio / Compuesto	Abarca (1993)	Galán (1993)	Soler y Téllez (2002)	Medio leche	Medio J.M
Harina de soya	6	20	2,9	-	-
Hidrolizado de caseína	-	-	0,5	-	-
Peptona de caseína	-	-	-	-	-
Extracto de levadura	-	-	-	0,1	0,1
Puré de tomate	40	-	-	-	-
Melaza	-	20	-	10	10
Leche	-	-	-	10	-

Cuadro 2: Composiciones en g/L de los siete compuestos más estudiados en la producción de *Bacillus thuringiensis*.

Fuente: Compuestos propuestos por Grupo de Biopesticidas del IBUN, 2013.

Detección y Medida del Crecimiento del *Bacillus thuringiensis*.¹¹

Existen diferentes sistemas para detectar y medir el crecimiento de microorganismos; los principales son: Recuento directo, es la medida de la masa de las células, recuento de variables, medida del número de partículas, medida de parámetros bioquímicos y medida de la actividad metabólica.

- Recuento directo: Consiste en la observación al microscopio de volúmenes muy pequeños de suspensiones de bacterias. Se usan unos portaobjetos especiales denominados cámaras de Petroff-Hausser. Para que la medida sea correcta es necesario que la densidad de células sea del orden de 10⁵ m/L.
- Medida de la masa de células: El sistema se basa en que las células en suspensión dispersan la luz causando la turbidez del cultivo. La turbidez depende de la masa en suspensión y, por tanto, midiendo esta se puede estimar aquella.
- Recuento de variables: Consiste en sembrar un volumen determinado de cultivo o muestra sobre el medio de cultivo sólido adecuado para estimar el

número de variables. Para que la medida sea correcta desde el punto de vista estadístico, es necesario contar más de 300 UFC. En ciertas ocasiones en las que la densidad de microorganismos es demasiado baja, éstos se pueden recolectar por filtración a través de una membrana (de 0.2 µm de poro) y posterior colocación de la membrana en un medio de cultivo adecuado para que se formen las colonias.

- Medida del número de partículas usando contadores electrónicos de partículas. Estos sistemas no nos indican si las partículas corresponden a células vivas o muertas; pero nos pueden dar una idea del tamaño de las partículas.
- Medida de parámetros bioquímicos tales como la cantidad de ADN, ARN, proteínas, etc. por unidad de volumen.
- Medida de actividad metabólica de las bacterias, cuando respiran producen una disminución del potencial redox del medio en que se encuentran como consecuencia del consumo de oxígeno (utilización de colorantes sensibles a oxidación-reducción tales como el azul de metileno).

Factores Físicos y Químicos que Influyen en el Crecimiento Bacteriano.

▪ Temperatura:

Cada microorganismo tiene una temperatura de crecimiento adecuada. Si consideramos la variación de la velocidad de crecimiento en función de la temperatura de cultivo, podemos observar una temperatura mínima por debajo de la cual no hay crecimiento; a temperaturas mayores se produce un incremento lineal de la velocidad de crecimiento con la temperatura de cultivo hasta que se alcanza la temperatura óptima a la que la velocidad es máxima. Por encima de esta temperatura óptima, la velocidad de crecimiento decae bruscamente y se produce la muerte celular.⁴

▪ pH:

Es un parámetro crítico en el crecimiento de microorganismos ya que cada tipo de microorganismo tiene un rango de pH en el que puede vivir

adecuadamente, fuera de este rango muere. El pH intracelular es ligeramente superior al del medio que rodea las células ya que, en muchos casos, la obtención de energía metabólica depende de la existencia de una diferencia en la concentración de protones a ambos lados de la membrana citoplásmica. El pH interno en la mayoría de los microorganismos está en el rango de 6,0 a 8,0. La disminución del pH se puede deber a varios factores, uno de los cuales es la liberación de ácidos orgánicos de cadena corta (fórmico, acético, láctico) por ciertas bacterias.¹¹

Condiciones de Crecimiento de *Bacillus thuringiensis* para la Formación del Complejo Espora-Cristal.

Es importante señalar que una fórmula basada en la combinación de nutrientes para una variedad de *Bacillus thuringiensis*, no necesariamente es adecuada para otra variedad, por lo que la calidad de la delta-endotoxina depende tanto del medio de cultivo como del aislado de *Bacillus thuringiensis* utilizado. Aunque obviamente, el diseño del medio y la bacteria no son los únicos aspectos involucrados en la producción del bioinsecticida, existen otras variables que deben considerarse en el proceso de la fermentación como: la temperatura óptima de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* oscila entre los 28 y 32°C. Durante el proceso de producción de *Bacillus thuringiensis* es importante considerar el suministro de oxígeno porque esta bacteria requiere un elevado nivel de este gas, en especial durante la fase de crecimiento exponencial. Esta demanda disminuye durante la esporogénesis y en la etapa de lisis del esporangio y liberación de la delta endotoxina. Esto permite disminuir el suministro de aire en la etapa final de la producción, lo que representa una economía en el proceso. Cuando se eleva el suministro de oxígeno y dado que se utilizan medios de cultivo ricos en proteínas, existe el riesgo de que se produzca un exceso de espuma; por lo cual es necesario, en ocasiones, adicionar antiespumantes. Esto debe hacerse con cuidado y el antiespumante seleccionado no debe afectar el desarrollo de la bacteria. Además, un exceso de este producto puede crear una anaerobiosis parcial

con detrimento de la calidad del proceso. También puede ocasionar problemas durante el recobrado y la formulación, la velocidad de agitación para asegurar un suministro de oxígeno adecuado en el medio de cultivo y evitar la acumulación del calor y evitar la inhibición o reducción de la calidad tóxica de los cristales. En la fermentación, la aireación tiene dos finalidades, suministrar oxígeno y extraer el calor producido. En general, el pH inicial debe ser de 6,8-7,2 pero baja después de las primeras 8-12 horas, hasta llegar a 5,0. Posteriormente se incrementa lentamente y al final el proceso tiene un valor aproximado de 8,0. Esta cinética es un buen indicador del proceso.¹¹

¿Cómo es la Harina de Soja?

La soja se ha utilizado en Asia en la alimentación humana desde hace unos 5000 años siendo crucial en la nutrición de estos pueblos; se considera como oleaginosa y sus principales componentes son la proteína y la grasa. Las proteínas son esenciales para el crecimiento del organismo y para la reparación de los tejidos. La soja es la leguminosa que tiene mayor cantidad y mejor calidad de proteínas y por esto, se utiliza para fortificar productos a base de cereales y el trigo. La planta es muy sensible al fotoperiodo, la radiación solar controla la transformación del periodo vegetativo al de floración; también afecta la velocidad del crecimiento durante la etapa de maduración.¹²

Composición de la Harina de Soja.¹²

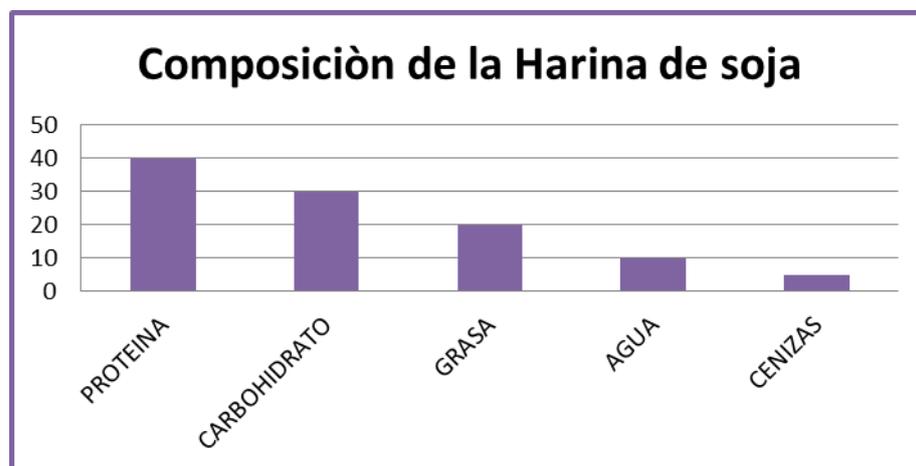


Gráfico 1: Composición nutricional de la Harina de Soja en %.
Fuente: Elaboración propia, 2016.

Harina de Soja como Inductor de Producción.

La Harina de Soja es un buen inductor de producción del *Bacillus thuringiensis*, ya que este compuesto posee 40% de proteínas, la cual constituye un alimento de elevado valor nutritivo, siendo el requerimiento nutricional primordial en la reproducción del *Bacillus thuringiensis*, ya que aportan los aminoácidos esenciales para el organismo, ocasionando la activación de la toxina activa (Cristal Proteico).¹²

2.3. Hipótesis.

✓ Hipótesis General.

- La mayor concentración entre (0; 60; 80 y 100)ppm de harina de soja (*Glycyne max*), resultará ser el inductor de mayor producción de *Bacillus thuringiensis* con fines de utilización como bioinsecticida.

✓ Hipótesis Específicos.

- La harina de soja resultará ser el inductor en el crecimiento y producción de *Bacillus thuringiensis* con fines de utilización como bioinsecticida.
- Las variables como temperatura y pH tendrán influencia en la producción de *Bacillus thuringiensis* con fines de utilización como bioinsecticida.
- Será la curva de consumo del inductor determinada por tiempo mínimo para la producción de *Bacillus thuringiensis*.
- Será factible comprobar la efectividad del bioinsecticida a base de harina de soja con la que mejor indujo a la producción de *Bacillus thuringiensis*.

2.4. Definición de Términos Básicos.

Insecticida: Son sustancias o mezcla de sustancias de origen natural o sintético destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier insecto, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte

o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y alimentos para animales.⁹

UFC: Unidad formadora de colonia.

Bioinsecticida: Compuesto formado/creado sin la presencia de compuestos químicos, siendo amigable para el ambiente.⁷

pH: Potencial de hidrógeno.

El Cristal Paraesporal: Se ubica en el interior del esporangio, generalmente, fuera del exosporio, sin embargo, se han descrito cristales paresporales dentro del exosporio en algunos aislamientos, con lo que el cristal y esporas continúan juntos tras la lisis celular.¹¹

Delta-endotoxina: Presentan actividad tóxica contra insectos, lepidópteros, dípteros, coleópteros, nemátodos, ácaros.¹⁰

Inductor de Producción: Las proteínas que constituyen un alimento de elevado valor nutritivo, siendo el requerimiento nutricional primordial en la reproducción del *Bacillus thuringiensis*.¹²

Ppm: Es una unidad de medida con la que se mide la concentración, Se refiere a la cantidad de unidades de una determinada sustancia (agente, etc.) que hay por cada millón de unidades del conjunto.¹³

Bioreactor: Es el dispositivo donde hay cambio en la composición debido a la reacción química, es cualquier recipiente donde ocurre una reacción química.

Nocivo: Que es dañino o perjudicial.¹⁵

Cepas: Una variante fenotípica de una especie o, incluso, de un taxón inferior, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias.¹⁸

Matraz Erlenmeyer: Frasco de Erlenmeyer, matraz Erlenmeyer, o simplemente Erlenmeyer o matraz, también conocido como matraz de síntesis extrema de químicos, es uno de los frascos de vidrio más ampliamente utilizados en laboratorios de Química y Física.

Complejo Espora y Cristal: Intoxica insectos-plaga (IP) de los órdenes: Lepidóptera, Díptera y Coleóptera.⁴

Bt: *Bacillus thuringiensis*.

2.5. Identificación de Variables.

Variable Independiente.

- La harina de soja a diferentes concentraciones (0, 60, 80, 100) ppm.

Variable Dependiente.

- Producción de *Bacillus thuringiensis*.

2.6. Operacionalización de las variables.

Tabla 1: Operacionalización de las variables.

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIÓN	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN
Dependiente: Producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	Microorganismos bacterianos, pertenecientes al grupo de los bacilos en la clasificación de Gram y en el orden taxonómico conforma a la familia Bacillaceae. Actúan formando compuestos proteicos de origen insecticida (delta endotoxina).	Las utilizaciones de instrumentos permitirán determinar la producción de Biomasa (<i>Bacillus thuringiensis</i>).	Producción de Biomasa (<i>Bacillus thuringiensis</i>)	<ul style="list-style-type: none"> Se mide por el número de UFC (Unidad Formadora de Colonias). 	<ul style="list-style-type: none"> Discreta: Unidad. Razón/proporción: Tamaño grande y pequeño.
Independiente: La Harina de Soja a diferentes concentraciones (0; 60; 80 y 100) ppm.	Compuesto capaz de inducir a la producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> , por presentar los componentes del requerimiento nutricional primordial para la reproducción de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	Producción de <i>Bacillus Thuringiensis</i> .	Contenido Proteico (Proteasas).	<ul style="list-style-type: none"> Contenido proteico a diferentes concentraciones. 	<ul style="list-style-type: none"> Razón/proporción: mg/L
	Fuente de crecimiento, inductor de esporulación y formación de la delta-endotoxina (Sub-unidad A y Sub-unidad B).	Proteína Tóxica para insectos plaga (lepidópteros, coleópteros, dípteros, protozoos, etc.).	Catalizadores biológicos (Biocatalizadores) que actúan a nivel intestinal (Sub-unidad B) y a nivel neurotrópico (Sub-unidad A).	<ul style="list-style-type: none"> Aceleran y Desaceleran reacciones bioquímicas (Bt. Microorganismo). 	<ul style="list-style-type: none"> Continua: ml, mg, etc.

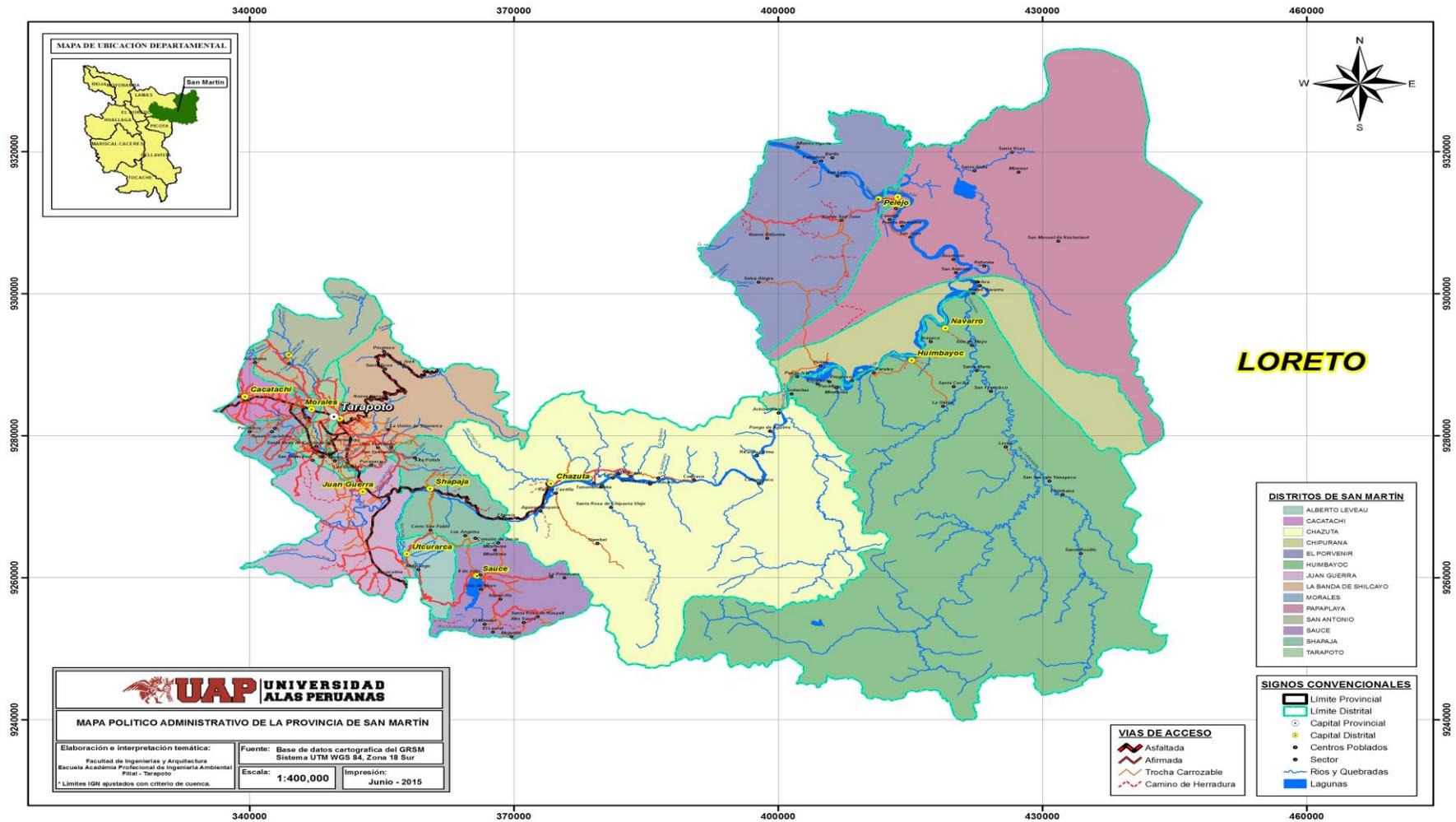
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

CAPITULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.

3.1 Ámbito de estudio.

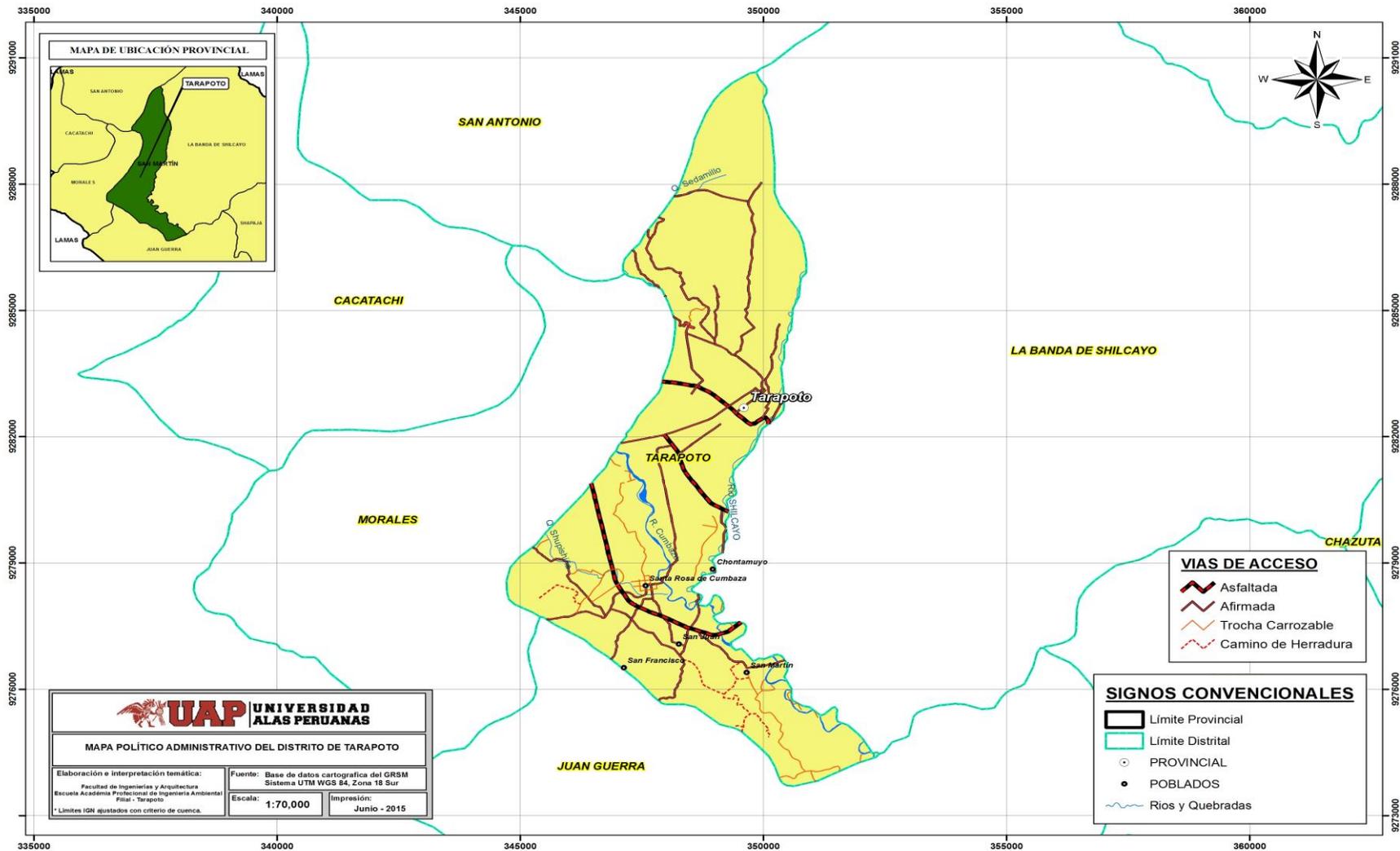
El ámbito de estudio de la presente investigación es en la Región, Provincia de San Martín y Distrito de Tarapoto, cuya población del distrito es de 120000 habitantes, ubicada a los 353 m.s.n.m. y la Provincia de San Martín tiene una variación de 120 m.s.n.m. hasta más de 1,600 m.s.n.m. La ciudad de Tarapoto se encuentra en los valles de los ríos Cumbaza y Shilcayo, la temperatura fluctúa entre los 36°C hasta los 42° C.

La ejecución de la tercera etapa del proyecto se llevó acabo en el distrito de Morales, cuya población oscila en los 72658 habitantes y los ensayos del proyecto se llevó acabo en la Universidad Nacional de San Martín, facultad de Ciencias Agrarias, ubicada con coordenadas en dirección este de 348756 y en dirección norte de 9282073, a continuación, se adjuntan los mapas de ubicación del ámbito de estudio.



Mapa 1: Mapa de ubicación de la Provincia de San Martín.

Fuente: Elaboración Propia, 2016.



Mapa 2: Mapa de ubicación del Distrito de Tarapoto.

Fuente: Elaboración Propia, 2016.



Mapa 3: Mapa de ubicación satelital de la Facultad de ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto-ejecución etapa 3 de proyecto.

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

3.2 Tipo de Investigación.

El tipo de investigación según la naturaleza de la información se considera una investigación Cuantitativa, debido a que se evaluará las concentraciones de la Harina de soja para la producción de *Bacillus thuringiensis* en el laboratorio. Según el método de la Investigación Experimental de Beatriz Arquero Palomino, Ana Berzosa Alonso, Noelia García Muños y Miriam Monja Morales (2009). Según Carrasco Díaz (2006:42).

3.3 Nivel de la investigación.

El grado de profundidad con el que se va a realizar el trabajo de investigación es descriptiva por que proporciona una respuesta a las preguntas de cómo ocurrió algo y quién estuvo involucrado, pero no del por qué sucedió algo o del por qué alguien estuvo involucrado, Según la Psic. Martha Patricia Sierra Guzmán (2012). Explicativa porque se encarga de buscar el porqué de los hechos mediante el establecimiento de relaciones causa-efecto, Beatriz Arquero Palomino (2009). Experimental, Según Carrasco, la investigación experimental responde a las preguntas: ¿Qué cambios y modificaciones se han producido?, ¿qué mejoras se han logrado?, ¿cuál es la eficiencia del nuevo sistema?, etc., busca las respuestas al fenómeno es estudio.

3.4 Método de la Investigación.

El método de la Investigación es Experimental, Según el Beatriz Arquero Palomino, Ana Berzosa Alonso, Noelia García Muños y Miriam Monja Morales (2009). y se desarrollará acabo en tres etapas y estas consisten en:

ETAPA 1: GABINETE INICIAL

En la presente etapa se realizarán las siguientes actividades:

- Se realizaron los trámites respectivos para obtener el permiso donde se ejecutará el desarrollo del proyecto, Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto.
- Recopilación de información bibliográfica de revistas, artículos, libros, etc. necesaria para el desarrollo del proyecto.

- Adquisición del cultivo de *Bacillus thuringiensis*, cedidos por parte del ICT, a través de la Universidad nacional de México.
- Diseño y elaboración de 4 Biorreactores y de las paletas Rushton.

ETAPA 2: LABORATORIO.

En la presente etapa se realizarán las siguientes actividades:

- Preparación y esterilización de los materiales a utilizar, incluido los 4 Biorreactores.
- Reactivación del *Bacillus thuringiensis* con el Agar Nutritivo.
- Siembra del *Bacillus thuringiensis* en dos (02) placas petris por medio de la técnica de estría con el asa de drigalski.
- Preparación de Solución Salina Fisiológicamente Estéril (SSFE) en 3 tubos de ensayos de 10 ml y otro tubo de ensayo completamente vacío.
- De los tres (03) tubos de ensayos que contienen SSFE se agregó 10ml a dos (02) placas petris y del tercer tubo restante se colocó 5ml para cada placa, obteniendo como resultado 15ml en las dos (02) placas.
- A continuación, se sembró de las dos (02) placas petris a un cuarto tubo de ensayo de 30ml y éste se llevó a esterilizar de 4°C a 5 °C.
- Se procedió a preparar el medio mínimo de Davis que fue de 600ml para los cuatro (04) Biorreactores, obteniendo un total de 2400 ml del medio.
- Luego a ello se preparó el inóculo con el caldo nutritivo que fue de 300ml en cuatro (4) matraces y se agregó 2ml del cuarto tubo de ensayo a cada uno de los cuatro matraces y se llevó a esterilizar por 24 horas a 37°C.
- Se pesó la Harina de Soja que fue de 60ppm, 80ppm y 100ppm y se llevó a esterilizar en horno por 24 horas.
- A las 48 Horas transcurridas, con todos los materiales esterilizados se realizó el vertimiento de los 1200 ml del caldo nutritivo en los cuatro Biorreactores, igualmente se hizo con el medio mínimo de Davis que fue de 2400ml y se colocó las tres diferentes concentraciones (60,80 y 100) ppm más el patrón, el cual no contenía concentración alguna de la Harina de Soja.

- Como resultado se obtuvo cuatro Biorreactores, patrón, 60ppm, 80ppm y 100 ppm y se agitaron (0, 4, 8 y 24) horas, con una velocidad de 500 RPM.
- Luego se extrajo cuatro muestras de 30 ul (0,03ml) del patrón, 60ppm, 80ppm y 100 ppm y se llevó a observar el microscopio con la ayuda de la Cámara de Neubauer-improved para el recuento.
- Por último, se realizó el recuento del patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100ppm de Harina de Soja en un microscopio de 10x por periodo de 3 días.
- Para finalizar se realizó la prueba de la efectividad del bioinsecticida a base de harina de soja en insectos del orden dípteros y coleópteros.

ETAPA 3: GABINETE FINAL

En la presente etapa se realizarán las siguientes actividades:

- Presentación, interpretación y sistematización de resultados.
- Elaboración del informe y presentación del mismo.

3.5 Diseño de investigación.

El tipo de diseño es Experimental, según Hernández (2006) la característica o elemento esencial del proyecto se realizará mediante la **Manipulación** de la variable independiente (la harina de soja a diferentes concentraciones), esto implica un manejo u operación deliberada por parte del investigador con respecto a la variable independiente, llamada también variable experimental o de tratamiento. Las características correspondientes al tipo de diseño a emplear es la **observación y medición**, según Ñaupas (2006) esta consiste en examinar atentamente el efecto que produce la manipulación de la variable independiente sobre la variable dependiente.

La investigación en la etapa experimental se realizó en el laboratorio de la Universidad Nacional de San Martín-Facultad de ciencias, la cual tuvo una duración de dos(02) meses

O: La harina de soja a diferentes concentraciones (0, 60, 80, 100) ppm.

M: Producción de *Bacillus thuringiensis*.

O → **M**

3.6 Población, muestra y muestreo.

- **Población.**

Cepa de *Bacillus thuringiensis*.

- **Muestra.**

Inóculo.

- **Muestreo.**

El muestreo se realizó según el protocolo para obtención de alícuotas para ensayos en biorreactores. Donde a partir del cultivo reactivado se procede a un escalamiento de reproducción teniendo en cuenta que el volumen de inoculación debe ser el 15 % del volumen de trabajo del reactor.

3.7 Técnicas e instrumentos de Recolección de Datos.

Las técnicas utilizadas son las siguientes:

Técnicas:

- Observación directa del experimento en el Laboratorio.
- Registro de coordenadas (UTM).
- Libreta de campo.
- SPSS.

Instrumentos:

Los instrumentos que se utilizarán son los siguientes:

- Uso del software ArcGis.
- pH-metro.
- Densímetro, Termómetro.

3.8 Procedimiento de Recolección de Datos.

El proceso que se llevará a cabo para realizar la investigación es la siguiente:

1. Se visitará el laboratorio de la Universidad Nacional de San Martín para solicitar el permiso correspondiente, para realizar la investigación.
2. Se seleccionará la población (Cepa de *Bacillus thuringiensis*).

3. El uso del programa Arcgis 10.1, para la elaboración de los mapas de ubicación del área de influencia (directa e indirecta).
4. Con el pH-metro se determinará que el medio se encuentre en condiciones óptimas para la reproducción del *Bacillus thuringiensis*.
5. El Densímetro permitirá obtener la densidad apta/ideal para el crecimiento y reproducción del *Bacillus thuringiensis*.
6. El termómetro permitirá determinar la temperatura ideal para la reproducción del *Bacillus thuringiensis*.

3.9 Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos.

- ✓ Las técnicas para el procesamiento de datos son las siguientes:
 - ❖ Preparación de la información.
 - ❖ Fase de la codificación.
 - ❖ Fase de almacenamiento de los datos obtenidos en el laboratorio.
- ✓ Análisis de Datos:
 - ❖ Análisis de la información recopilada.
 - ❖ Elección del método estadístico (SPSS).
 - ❖ Análisis estadísticos de los datos.

CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1 Presentación de Resultados.

El tipo de reacción empleada en el presente proyecto de acuerdo a su termicidad es exotérmica debido al desprendimiento de calor dentro del biorreactor, de acuerdo al modo de tratamiento de la carga el tipo de biorreactor es un sistema cerrado (sin intercambio de materia con el exterior), es decir la masa total es constante y con respecto al proceso que se lleva a cabo dentro del biorreactor es de tanque agitado, cabe recalcar que este proceso se apoyó con un termostato el cual permitió fijar la temperatura del medio dentro de los biorreactores.

Se probó las diferentes concentraciones de Harina de Soja, patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100ppm, de los cuales se obtuvieron los siguientes resultados; se realizó la evaluación de la agitación, temperatura y el control del pH.

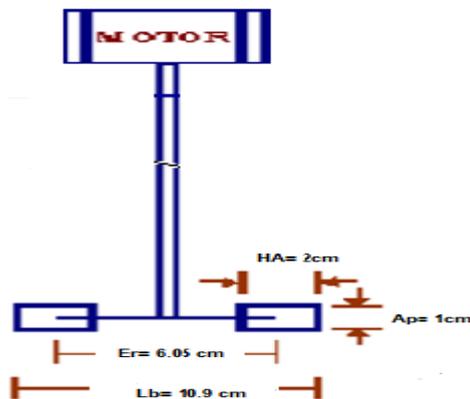


Figura 3: Características geométricas de la Paleta Rushton.

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

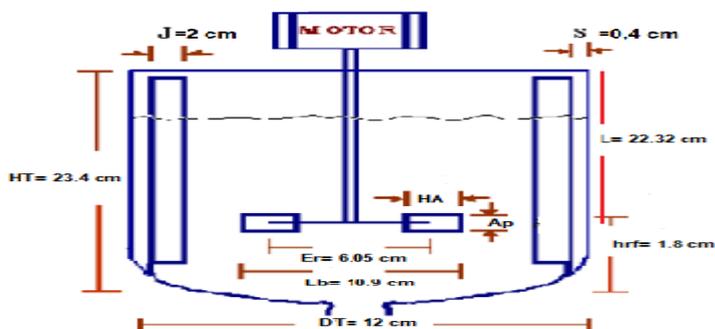


Figura 4: Características geométricas del Biorreactor.

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Reactivación de la cepa.

En la observación microscópica la cepa de *Bacillus thuringiensis* presentó células de forma bacilar, Gram positiva y espora ovalada en posición terminal (figura 5).

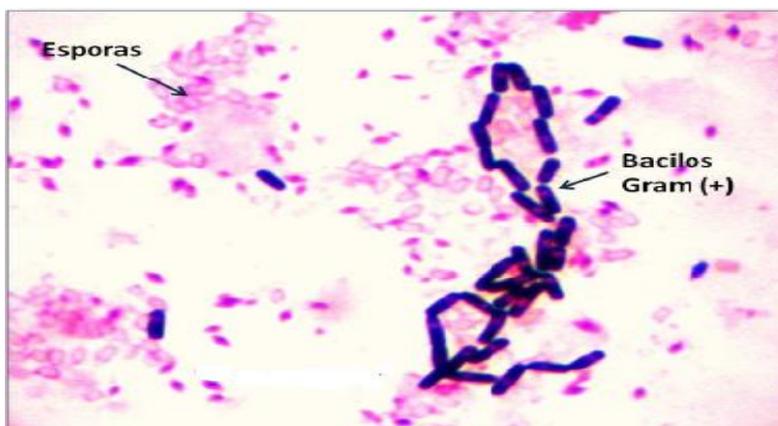


Figura 5: Vista microscópica en tinción Gram de *Bacillus thuringiensis*.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

4.1.1 Resultado de Análisis-Primer ensayo (0 horas).

Tabla 2: Producción de *Bacillus thuringiensis* del patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100ppm-Primer muestreo, realizado a las 0 horas y a 500 RPM.

Concentración de Harina de Soja (ppm)	Revoluciones por Minuto (RPM).	Producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> (UFC/ml)
PATRON(0)	500	3750000
60	500	13750000
80	500	20000000
100	500	25000000

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

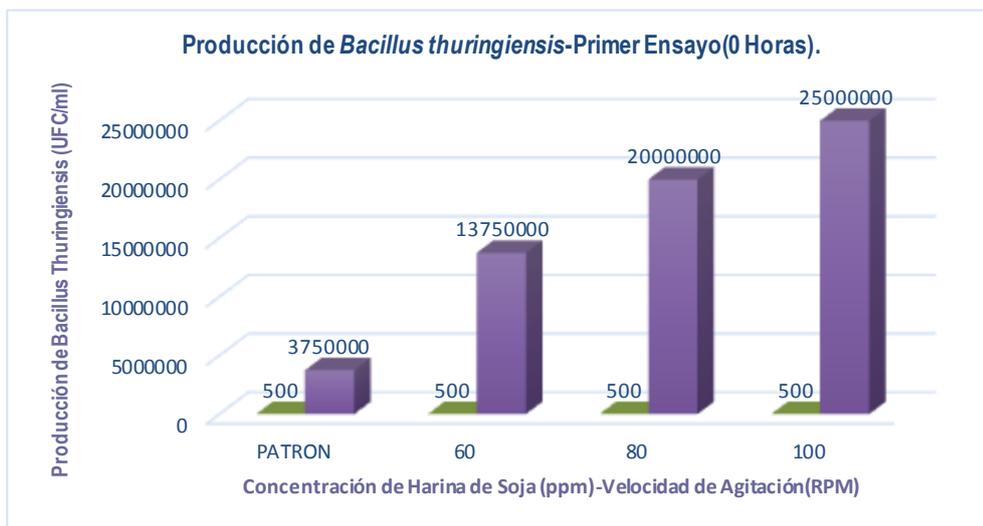


Gráfico 2: Comparación de producción de *Bacillus thuringiensis*-primer ensayo del Patrón (0ppm), 60 ppm, 80 ppm y 100ppm, a las 0 horas.

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

4.1.2 Resultado de Análisis-Segundo ensayo (4 horas).

Tabla 3: Producción de *Bacillus thuringiensis* del patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100ppm–Segundo ensayo, realizado a las 4 horas y a 500 RPM.

Concentración de Harina de Soja (ppm)	Revoluciones por Minuto (RPM).	Producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> (UFC/ml).
PATRON (0)	500	4,750,000
60	500	16,250,000
80	500	25,500,000
100	500	37,500,000

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

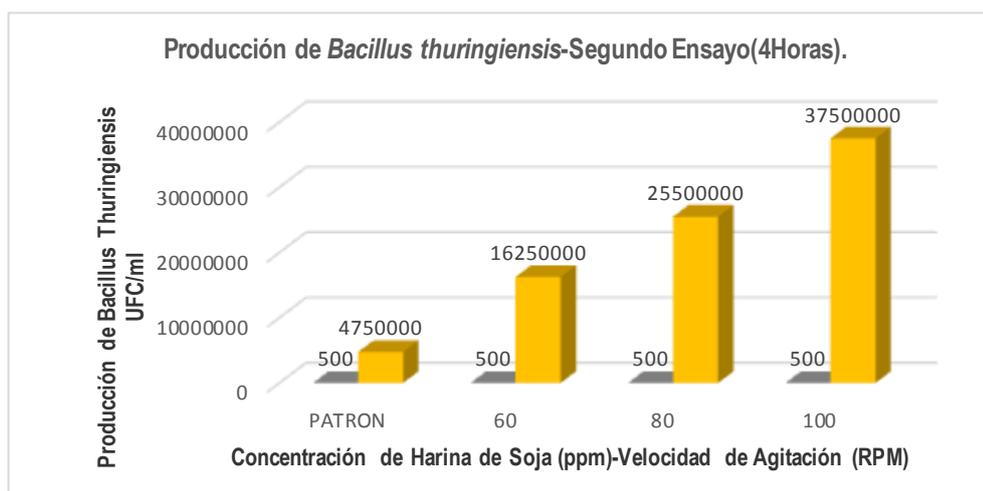


Gráfico 3: Comparación de producción de *Bacillus thuringiensis*-Segundo ensayo del Patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100 ppm a las 4 horas.

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

4.1.3 Resultado de Análisis-Tercer ensayo (8 horas).

Tabla 4: Resultado de la producción de *Bacillus thuringiensis* del patrón, 60ppm, 80ppm y 100ppm- Tercer ensayo, realizado a las 4 horas y a 500 RPM.

Concentración de Harina de Soja (ppm)	Revoluciones por Minuto (RPM).	Producción de <i>Bacillus thuringiensis</i>
PATRON (0)	500	4487500
60	500	23050000
80	500	39382500
100	500	43112500

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

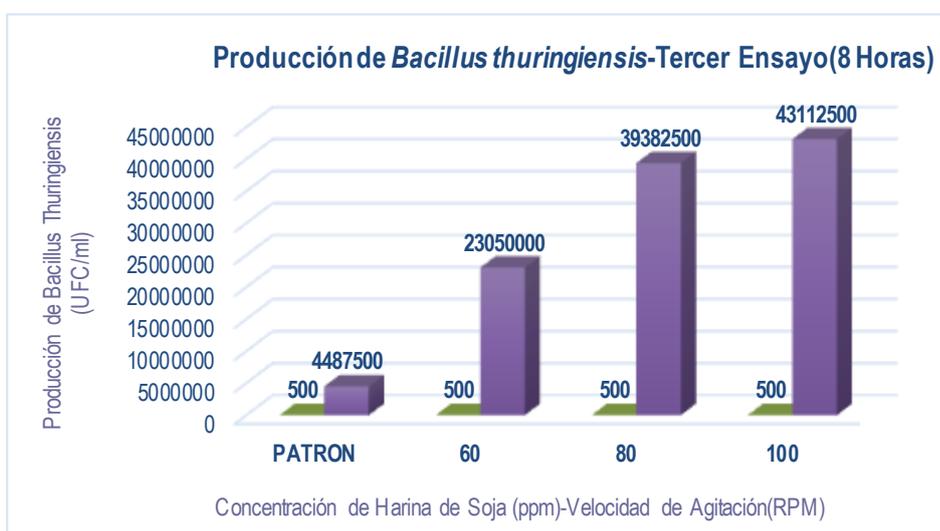


Gráfico 4: Comparación de producción de *Bacillus thuringiensis*-Tercer ensayo del Patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100 ppm a las 8 horas.

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

4.1.4 Resultado de Análisis-del cuarto ensayo (24 horas).

Tabla 5: Producción de *Bacillus thuringiensis* del patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100ppm-Cuarto ensayo, realizado a las 24 horas y a 500 RPM.

Concentración de Harina de Soja (ppm)	Revoluciones por minuto (RPM)	Producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> (UFC/ml)
PATRON	500	4750000
60	500	33000000
80	500	45000000
100	500	50057500

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

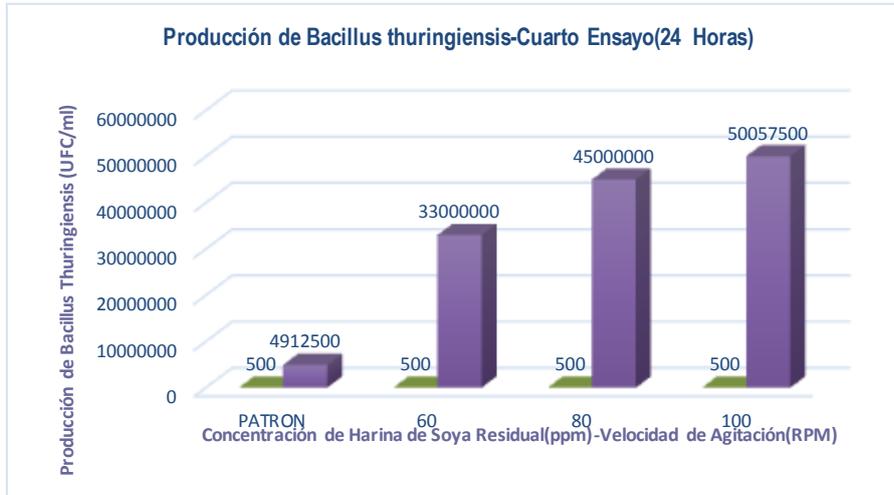


Gráfico 5: Comparación de producción de *Bacillus thuringiensis*-Cuarto ensayo del Patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100 ppm a 24 horas.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

4.1.5 Resultado de Análisis-Promedio.

Tabla 6: Producción de *Bacillus thuringiensis*-promedio del patrón, 60ppm, 80ppm y 100ppm.

Concentración de Harina de Soja (ppm)	Revoluciones por Minuto (RPM)	Producción de Bt(Promedio) UFC/ml
PATRON	500	4001000
60	500	13255000
80	500	32470625
100	500	38917500

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

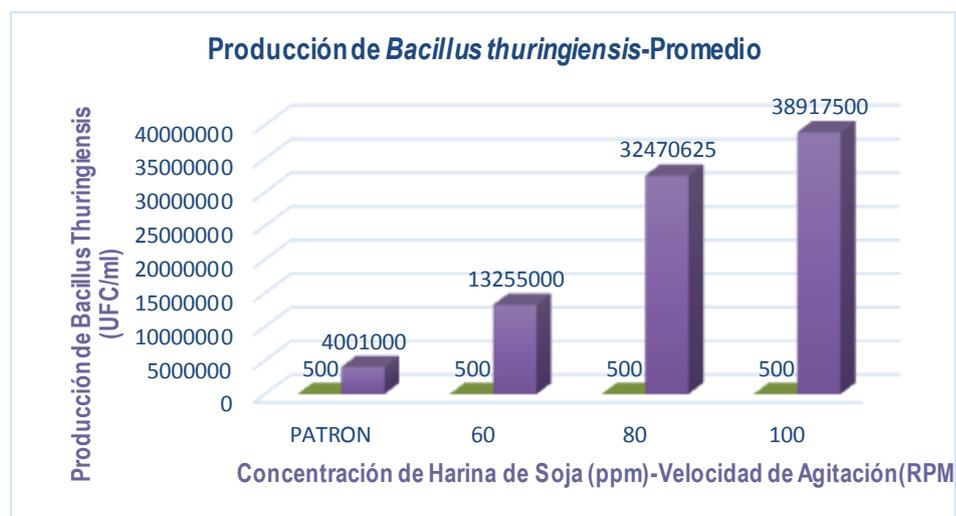


Gráfico 6: Comparación de producción de *Bacillus thuringiensis*-promedio del Patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100 ppm.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

4.1.6 Recuento en cámara Neubauer.

Los datos obtenidos en el recuento se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 7: Log recuento de producción de *Bacillus thuringiensis* en RPM.

Concentración de Harina de Soja (ppm)	pH	RPM	Tiempo de Fermentación (Horas)	Log(Recuento)	Tiempo de Recuento (Horas)
PATRON (0)	7.28	500	1	6.511883361	0
60	7.15	500	2	7.176091259	4
80	7.03	500	3	7.595303282	8
100	6.18	500	4	7.699469156	24

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

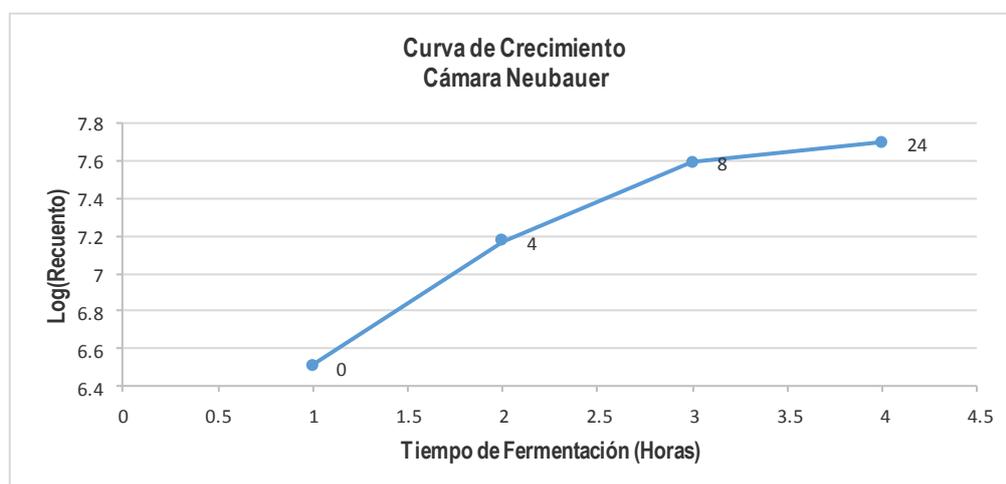


Gráfico 7: Curva de Crecimiento de las 4 concentraciones, Patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100ppm a las 0,4,8,24 horas del tiempo de recuento y a 4 horas del tiempo de fermentación, a 7.69 Log (Recuento).

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

El punto inicial es el T4 y el punto T8 el inicio de la fase estacionaria, es decir la actividad metabólica de producción de *Bacillus thuringiensis* empieza desde el tiempo T4 y en el T8 la producción de este microorganismos se mantiene en un determinado ritmo. La velocidad de crecimiento es determinada por la siguiente ecuación:

$$\ln_x - \ln_{x_0} = u (t - t_0)$$

Donde μ =velocidad de crecimiento, X= número de bacterias finales, X₀= número de bacterias

iniciales, t= tiempo final, t₀= tiempo inicial.

El tiempo de generación se representa en la siguiente ecuación:

$$T_g = \ln 2 / \mu$$

Concentración (ppm)	Velocidad de Crecimiento (μ)	Tiempo de Regeneración (Tg)-
Patrón (0)	0,58	1,17 Horas
60	0,69	59 min
80	0,71	57 min
100	0,71	56,45 min

Cuadro 3: Velocidad de crecimiento del *Bacillus thuringiensis* y su tiempo de regeneración de las 4 concentraciones de Harina de Soja.

Fuente: Elaboración Propia del IBM SPSS, 2016.

4.17 Medida del pH.

Se observa que el pH ha disminuido hasta T8. A partir de este tiempo fue disminuyendo hasta llegar a 6.18 que fue cuando culminó el proceso de fermentación.

Tabla 8: Valores obtenidos del pH.

Tiempo de Recuento(Horas)	pH	Tiempo de Fermentación(Horas)
0	7.28	1
4	7.15	2
8	7.03	3
24	6.18	4

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

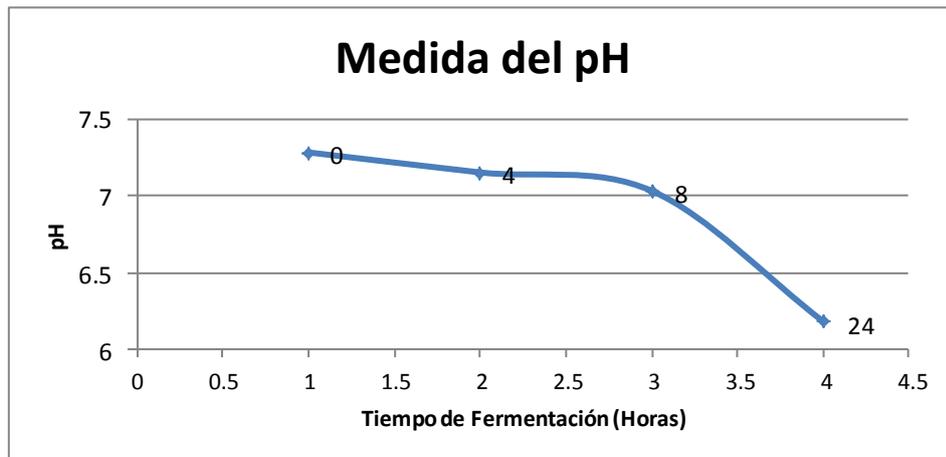


Gráfico 8: Evaluación del pH; obteniendo 6,18 a las 24 horas de recuento.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

4.1.8 Análisis estadístico.

El diseño que se eligió fue el Diseño Completamente al Azar (DCA). Los datos obtenidos en Excel fueron exportados al programa estadístico IBM SPSS Statistics 20 bajo la matriz que se observa en la tabla 9:

De izquierda a derecha, la primera columna indica la producción de *Bacillus thuringiensis*, observando sus diferencias en producción. Cada fila de la segunda columna representa las concentraciones de Harina de Soja a las que se expuso al Bt para su producción, 1 (0ppm-Patrón), 2 (60ppm), 3 (80ppm) y 4 (100ppm).

El primer análisis estadístico que se realizó en el programa SPSS fue el Análisis univariado de Variancia.

Tabla 9: Valores obtenidos de producción de *Bacillus thuringiensis* de diferentes concentraciones de Harina de Soja, Patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100 ppm a 24 horas e interpretados en el programa estadístico IBM SPSS.

Producción de Bt	Concentración de Harina de Soja(ppm)
4500000,00	1,00
4500100,00	1,00
4500155,00	1,00
4500220,00	1,00
4500280,00	1,00
30003300,00	2,00
30002350,00	2,00
30001200,00	2,00
30000500,00	2,00
30000000,00	2,00
45000000,00	3,00
45000230,00	3,00
45000355,00	3,00
45200436,00	3,00
45300546,00	3,00
50057500,00	4,00
50058520,00	4,00
50059526,00	4,00
50009651,00	4,00
50009744,00	4,00

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Factor Inter Sujetos

Concentración	N
1,00	5
2,00	5
3,00	5
4,00	5

Cuadro 4: Se muestra el número de repeticiones realizadas para cada concentración patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100ppm.

Fuente: Elaboración Propia del IBM SPSS, 2016.

Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error^a

Variable dependiente: Producción

F	df1	df2	Sig.
31,947	3	16	,000

Cuadro 5: Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error^a, $P < 0,05$, existen razones para decir que las varianzas sean iguales.

Fuente: Elaboración Propia del IBM SPSS, 2016.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Producción

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	6,283E+15 ^a	3	2,094E+15	403440,503	,000
Interceptación	2,101E+16	1	2,101E+16	4046996,053	,000
Concentración	6,283E+15	3	2,094E+15	403440,503	,000
Error	8,306E+10	16	5191124661		
Total	2,729E+16	20			
Total corregido	6,283E+15	19			

a. R al cuadrado = 1,000 (R al cuadrado ajustada = 1,000)

Cuadro 6: Prueba de igualdad de efectos inter-sujetos, nivel de significación es de 0,00 por lo tanto si existen diferencias significativas.

Fuente: Elaboración Propia del IBM SPSS, 2016.

Concentración

Variable dependiente: Producción

Concentración	Media	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1,00	4500151,000	32221,498	4431844,476	4568457,524
2,00	30001470,000	32221,498	29933163,476	30069776,524
3,00	45100313,400	32221,498	45032006,876	45168619,924
4,00	50038988,200	32221,498	49970681,676	50107294,724

Cuadro 7: Medias marginales estimadas.

Fuente: Elaboración Propia del IBM SPSS, 2016.

Producción

HSD Tukey^{a,b}

Concentración	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
1,00	5	4500151,0000	30001470,0000	45100313,4000	50038988,2000
2,00	5				
3,00	5				
4,00	5				
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Cuadro 8: Sub Conjuntos Homogéneos, Prueba Tukey.

Fuente: Elaboración Propia del IBM SPSS, 2016.

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 5191124661,000.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5,000.

b. Alfa = .05.

4.2. Ensayo de la efectividad del bioinsecticida a base de harina de soja a 100ppm, 200ppm y 300ppm en insectos de Orden dípteros y coleópteros en estado larvario.

Tabla 10: Ensayo de la efectividad del bioinsecticida a base de harina de soja a 100ppm, 200ppm y 300ppm, a una velocidad de agitación de 500 RPM.

HARINA DE SOJA						
Concentración (ppm)	Cantidad Dípteros	Muertos	Tiempo muerte (Horas)	Cantidad Coleópteros	Muertos	Tiempo muerte (Horas)
100	40	3	1	5	1	1
200	37	17	8	4	1	8
300	20	16	24	3	3	24

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Tabla 11: Parámetros Evaluados para la Harina de Soja para probar la efectividad bioinsecticida.

Parámetros Evaluados	
Ph	6,8
Densidad H ₂ O	0,9 gr/cm ³
Temperatura H ₂ O	29 °C
H ₂ O en placa	25 ml

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

4.2 Discusión.

En los cuatro ensayos realizados de las concentraciones, patrón (0ppm), 60ppm, 80 ppm y 100ppm a las (0, 4, 8 y 24) horas de tiempo de recuento, con una agitación de 500 RPM se obtuvo que en las tres últimas concentraciones (60, 80, 100)ppm produjeron mayor cantidad de *Bacillus thuringiensis* en UFC/ml, obteniendo así que a mayor concentración de Harina de Soja mayor producción de este mencionado organismo, con respecto al patrón (0ppm) también existió la presencia de esta bacteria sin existir concentración alguna de Harina de Soja, en este sólo existió el medio mínimo de Davis, ver gráficos 2, 3, 4, 5. La concentración que originó mayor producción de *Bacillus thuringiensis* fué de 100 ppm, obteniendo $5,0057500 \times 10^7$ en 24 horas, luego se realizaron posteriores ensayos con 200ppm y 300ppm evidenciando que la presencia de *Bacillus thuringiensis* es más notoria, por lo tanto se puede decir que si se hubiera realizado con 400ppm o 500 ppm existiría mejores resultados, según Vargas V.F (2010), la Harina de Soja contiene 40% de proteínas, siendo éste el inductor esencial de producción del *Bacillus thuringiensis* (ver gráfico 1).

En el análisis promedio de los cuatro diferentes ensayos a las 0, 4, 8 y 24 horas del tiempo de recuento de producción de *Bacillus thuringiensis* se vuelve a demostrar al igual que en el ítem anterior, que a mayor concentración de Harina de Soja mayor producción de *Bacillus thuringiensis*, obteniendo que a 100 ppm se produjo $3,891500 \times 10^7$ UFC/ml, gráfico 6; según Vargas V.F (2010), la Harina de Soja contiene 40% de proteínas, siendo éste el inductor esencial de producción de *Bacillus thuringiensis* (ver gráfico 1).

De los gráficos 2, 3, 4, 5 y 6 se obtuvieron que el patrón en el cual no existió concentración alguna de harina de soja pero si existió medio mínimo de Davis la producción de *Bacillus thuringiensis* fué menor que en el resto de las concentraciones, obteniendo que a las 24 horas del tiempo de recuento se obtuvo $4,750000 \times 10^6$ UFC/ml a una velocidad de agitación de 500 RPM, Según William (2010) el medio mínimo es un medio de cultivo que contiene los nutrientes mínimos indispensables para el crecimiento de una colonia, por lo general sin la presencia de

aminoácidos, pero según Vargas V.F (2010), la Harina de Soja contiene 40% de proteínas, siendo éste el sustrato esencial que origina la producción del *Bacillus thuringiensis*.

Con respecto a la velocidad de agitación se realizó a 500 RPM obteniendo resultados óptimos para la producción del *Bacillus thuringiensis* y de acuerdo a otros autores señalan que a 400 RPM y 600 RPM en reactores de 14 litros la producción de este microorganismo es masivo según Camacho. C (2012), y el presente proyecto se realizó a 500 RPM, este valor se encuentra dentro del rango propuesto por Camacho, obteniendo resultados significativos en la producción de este microorganismo.

El pH es un parámetro físico-químico importante durante el proceso de producción. Es por ello, que iniciando el proceso se debe ajustar el medio a un pH entre 6,8-7,2 que es el rango de pH óptimo para este microorganismo. Luego, el pH baja después de 8-12 horas (Orietta, 2002), ello se debe a que el *Bacillus thuringiensis* libera ácidos lácticos que dan origen a la toxina activa. Esto concuerda con nuestros resultados que el pH empezó a bajar progresivamente. Sin embargo, hay que tener en cuenta que un pH cercano a 5 puede inhibir el proceso de desarrollo de esta bacteria, y de acuerdo a los resultados obtenidos, el pH fue de 6,18 a las 24 horas del tiempo de recuento, el descenso del pH se debe a que cuando el cristal proteínico es ingerido por un insecto susceptible en fase larvaria llega a su intestino medio, se disuelve por la acción de los jugos intestinales ocasionando que el pH descienda.

La temperatura a la que se tuvo expuesto el *Bacillus thuringiensis* fue de 30° C, ajustándolo con un termostato, ello permitió y/o facilitó la producción de este microorganismo a diferentes concentraciones, según Dulmage (1981) el rango de temperatura óptimo para la mayor producción de *Bacillus thuringiensis* ocurre de 28-30°C y ello concuerda con el presente trabajo de investigación.

El tiempo de recuento para la producción de *Bacillus thuringiensis* fué de 0, 4, 8 y 24 horas, si se hubiera realizado con un tiempo de recuento mayor de 24 horas, es decir 48 horas o más, se hubiera obtenido producciones altas de *Bacillus*

thuringiensis, según Tapia (2012) a mayor tiempo de recuento se obtendrá mejores resultados de producción de este microorganismo y a su vez se podría graficar la curva de crecimiento con mayor facilidad.

De los resultados alcanzados (ver tabla 11), se realizó la prueba de la efectividad del bioinsecticida a base de harina de soja a 100ppm, 200ppm y 300ppm, se corrobora y demuestra que el bioinsecticida a base de harina de soja posee eficacia insecticida y se observa que a mayor concentración de harina de soja la efectividad insecticida aumenta, si se hubiera ensayado la efectividad insecticida de la harina de soja a una concentración de 500 ppm los resultados en las muerte de los insectos larva del orden dípteros y coleópteros hubiera aumentado, disminuyendo el tiempo de muerte de estos insectos en estado larvario.

CONCLUSIONES

La concentración de Harina de Soja que produjo mayor producción de *Bacillus thuringiensis* en los cuatro ensayos fue de 100ppm en los 0, 4, 8 y 24 horas del tiempo de recuento a 500 RPM, a las 24 horas se produjo $5,057500 \times 10^7$ UFC/ml y en los análisis promedio se obtuvo $3,89175500 \times 10^7$ UFC/ml (ver gráfico 2, 3, 4, 5, 6).

El inductor (harina de soja) facilitó el crecimiento y producción de *Bacillus thuringiensis*, observando producciones altas de $4,3112500 \times 10^7$ y $5,0057500 \times 10^7$ de este microorganismo a las 8 y 24 horas del tiempo de recuento, comparado con el obtenido con el medio patrón (Medio Mínimo de Davis) originando la producción más baja de *Bacillus thuringiensis* en los cuatro diferentes ensayos (ver gráfico 2, 3, 4, 5 y 6).

Los resultados del análisis del diseño experimental, demostraron que la influencia de las variables de pH y temperatura para la producción de *Bacillus thuringiensis* son: control de pH de 6,18, y la temperatura de 29° C (ver tabla 7).

El Tiempo mínimo para la producción de *Bacillus thuringiensis* fue de T24 horas (ver gráfico 7).

De acuerdo a los resultados obtenidos (Gráfico 5) se obtuvo que la producción de *Bacillus thuringiensis* a una concentración de 100ppm de Harina de Soja es de $5,0057500 \times 10^7$ UFC/ml, se concluye que la harina de soja es un sustrato que induce la producción de este microorganismo, de acuerdo a la literatura, la harina de soja contiene el 40 % de proteínas, siendo éste una fuente inductor de producción del *Bacillus thuringiensis*.

La efectividad bioinsecticida a base de harina de soja a 100ppm, 200ppm, 300ppm resultó ser óptima, obteniendo el 90% de muertes de insectos del orden dípteros en estado larvario y de orden coleópteros un 99.9 % en un periodo de tiempo de 24 horas.

El diseño y elaboración del biorreactor influyó de manera directa sobre la producción de *Bacillus thuringiensis*, observando que a mayor tiempo de fermentación (horas) mayor producción de este microorganismo.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda experimentar con otros medios de cultivo tales como la sanguaza, puré de tomate, harina de pescado, extracto de levadura y otros, con la finalidad de demostrar si son inductores de crecimiento y producción de *Bacillus thuringiensis*.
- Es muy importante el control de la influencia de las variables (pH, temperatura y concentración) ya que estos inciden en la producción del *Bacillus thuringiensis*, por ello recomiendo controlar igualmente la densidad, oxígeno disuelto, cantidad de azúcar presente en el medio de cultivo.
- Recomiendo que el tiempo mínimo para la producción de *Bacillus thuringiensis* deberá de ser de 48 horas, con el fin de obtener producciones altas de este microorganismo.
- Recomiendo probar la efectividad del bioinsecticida a base de harina de soja con una concentración de 500ppm, queda demostrado que a mayor concentración mayor efectividad en las muertes de los insectos en estado larvario.
- Se recomienda probar la efectividad del bioinsecticida a base de *Bacillus thuringiensis* en un cultivo de Café y Cacao que esté siendo afectado por insectos plaga.
- Recomiendo realizar ensayos de producción de *Bacillus thuringiensis* en biorreactores con capacidad mayor de 2 litros con la finalidad de obtener producciones altas de este microorganismo.
- Recomiendo realizar producciones de *Bacillus thuringiensis* a diferentes concentraciones en diferentes tiempos, con la finalidad de observar cual es la concentración que produce más *Bacillus thuringiensis* en un determinado tiempo.

Referencia Bibliográfica.

1. Beltrán L et al (2012) "Estrategia para el diseño de un medio de cultivo para la fermentación con *Bacillus*".
2. Cerdán, Willian Blas. «Producción de biomasa de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis mutante en un medio fermentativo a base de sanguaza.» 31 (2011).
3. Cabrera, Bertha. «Control biológico Evaluación de cepas de *Bacillus thuringiensis*.» Fitosanidad, 2009: 83-87.
4. Escobar, Jenny M. «Análisis exploratorio para la optimización de un medio de cultivo para la fermentación de *Bacillus thuringiensis*.» 2004 (2004).
5. Ruiz de Escudero, I. Ibañez, I. Padilla, M.A. Carnero, A. Caballero, P. «Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de " *Bacillus thuringiensis*" procedentes de muestras de tierra de Canarias.» Bol.San.Veg.Plagas., 2004: 703-712.
6. Sauka, Diego H. «*Bacillus thuringiensis*: Generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidopteros que son plagas agrícolas.» Revista Argentina de Microbiología, 2008: 124-140.
7. Maduell Soler, Pau. «Estudio de la ecología de *Bacillus Thuringiensis* en la hoja.» 2007: 96.
8. Ruiz de Escudero IIPMACACP. Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de " *Bacillus thuringiensis*" procedentes de muestras de tierra de Canarias; 2004.grado Td.: 1-87; 2009.
9. Cabrera Mdcc. Produccion de bacillus thuringiensis: 1-87; 2009.
10. Orietta, 2002. Medios de cultivos optimos para el crecimiento del Bt.pdf.
11. Vargas V.F. (2010). Producción de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. Israelensis utilizando espárrago (*Asparagus officinalis*) y su uso potencial para el control de la Malaria en la Libertad- Perú.

12. Noticiero de Desarrollo Tecnológico en Alimentos. Editado por: PUAL. Número 3-1991. Universidad Nacional Autónoma de México.
13. Estrada, Clara Inés Nicholls. «Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico.» Ciencia y Tecnología, 2008: 1-200.
14. Ames, Verónica Cañedo Teresa. Manual de laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima: Centro Internacional de la Papa, 2004.
15. Camacho, Carolina Abarca. «Optimización del proceso de fermentación para producir *Bacillus thuringiensis* Var. Aisawai.» Centro de Investigación en Biotecnología, 2012: 1-6.
16. Méndez, Nancy Patricia Chaves. Utilización de bacterias y hongos endofíticas para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorn. Tesis para Maestría, Costa Rica: Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación, 2007.
17. Harina de soja. 18 de octubre de 2016. http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/harina-de-soja-44-pb (último acceso: martes de octubre de 18).
18. Moreno, Edna Elisa Ponce. "Recuperación de Cepas HD de *Bacillus thuringiensis*. Tesis, México: Universidad Autónoma de Nuevo León, 2005.
19. Levenspiel, Octave. «Ingeniería de las Reacciones Químicas.» En Ingeniería de las Reacciones Químicas, de Octave Levenspiel, 677. México, 2004.

Artículo Científico

“EVALUACION DE DIFERENTES CONCENTRACIONES (0, 60, 80, 100) ppm DE HARINA DE SOJA (*Glycine max*) COMO INDUCTOR DE PRODUCCIÓN DE *Bacillus thuringiensis* CON FINES DE UTILIZACION COMO BIOINSECTICIDA, DISTRITO DE TARAPOTO, SAN MARTIN-2016”

RESUMEN

Un bioinsecticida es considerado como el producto bacteriano o actividad bacteriana que da como resultado la muerte de un insecto. Una de las formulaciones comerciales más usadas actualmente está basada en la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Esta bacteria sintetiza durante su fase de esporulación una proteína (delta-endotoxina), que muestra una actividad insecticida única. Al ser ingerido la delta-endotoxina por larvas susceptibles, afecta el intestino de los insectos causándoles la muerte. Existen endotoxinas específicas contra lepidópteros, dípteros, coleópteros.³

Este trabajo se realizó con la finalidad de evaluar diferentes concentraciones Patrón (0ppm), 60 ppm, 80ppm y 100ppm de Harina de Soja como inductor de producción de *Bacillus thuringiensis* utilizado como un Bioinsecticida. El presente trabajo de investigación busca dar alcance para producir un Bioinsecticida a bajo costo y en poco tiempo con el fin de suplir la utilización de los insecticidas que contaminan el medio ambiente.

El procedimiento aplicado fué según el protocolo para obtención de alícuotas para ensayos en biorreactores. A partir del cultivo reactivado se procedió a un escalamiento de reproducción teniendo en cuenta que el

volumen de inoculación fué de 15 % del volumen de trabajo del biorreactor.¹³

De los resultados obtenidos se demostró que las cuatro concentraciones diferentes de harina de soja la que induce a la producción de *Bacillus thuringiensis* en los 4 diferentes ensayos que se realizó a las 0, 4, 8 y 24 horas del tiempo de recuento, con una velocidad de agitación de 500 RPM, ph que oscila entre los 6.18 a 7.28 a una temperatura de 30°C fué de 100ppm.

Se realizó la prueba de la efectividad del bioinsecticida a base de harina de soja en insectos larvas del orden dípteros y coleópteros a las condiciones de trabajo, ph de 6.8, densidad del agua 0.9 gr/cm³, temperatura del agua 29°C, obteniendo como resultado que el bioinsecticida a base de harina de soja mató el 90% de los insectos del orden dípteros y 99,9% al orden coleópteros, ambos en estado larvario, en periodos de 1, 8 y 24 horas de monitoreo.

La concentración que originó mayor producción de *Bacillus thuringiensis* fué de 100 ppm, obteniendo 5,0057500 x10⁷ UFC/ml en un tiempo de 24 horas, luego se realizaron posteriores ensayos con 200ppm y 300ppm evidenciando que la presencia de *Bacillus thuringiensis* es más notoria, por lo tanto se puede decir que si se hubiera realizado con 400ppm o 500 ppm existiría producciones más altas, se corrobora y demuestra que la harina de soja tiene eficacia insecticida y se observa que a mayor concentración de harina de

soja la efectividad insecticida aumenta, si se hubiera ensayado la efectividad insecticida de la harina de soja a una concentración mayor de 500 ppm los resultados en la muerte de los insectos larvas del orden dípteros hubiera aumentado, disminuyendo el tiempo de muerte de estos insectos larva.

El presente trabajo de investigación demostró que el inductor (harina de soja) facilitó el crecimiento y producción de *Bacillus thuringiensis*, observando producciones altas de $4,3112500 \times 10^7$ UFC/ml y $5,0057500 \times 10^7$ UFC/ml de este microorganismo a las 8 y 24 horas del tiempo de recuento a una velocidad de agitación de 500RPM.

Palabras clave: Bioinsecticida, Insecticidas, Contaminación, Medio Ambiente.

"EVALUATION OF DIFFERENT CONCENTRATIONS (0, 60, 80, 100) ppm GIVES FLOUR OF SOYBEAN (*Glycine max*) AS INSTIGADOR OF PRODUCTION *Bacillus thuringiensis* MEETS ON ENDS OF UTILIZATION AS BIOINSECTICIDA, DISTRICT OF TARAPOTO, SAN MARTIN-2016 "

A bioinsecticida is considered to be the bacterial product or bacterial activity that gives like proved the death of an insect. One of the most secondhand commercial formulations nowadays is based on the bacterium *Bacillus thuringiensis*. This bacterium synthesizes during his phase of esporulación a protein (delta - endotoxina), which shows the insecticide only activity. On the delta - endotoxina having been consumed by capable larvas, it affects the intestine of the insects they causing the death. They exist endotoxinas specific against lepidopterous, dípteral, coleópteros.³

East work was realized by the purpose of evaluating different concentrations Boss (0ppm, 60 ppm, 80ppm and 100ppm of Flour of Soybean as instigador of production of *Bacillus thuringiensis* used as a Bioinsecticida. The present work of investigation seeks to give scope to produce a Bioinsecticida to

low cost and in a little time in order to replace the utilization of the insecticidas that they contaminate the environment.

The applied methodology was according to the protocol for obtaining aliquot for tests in biorreactores. From the reactivated culture one proceeded to a climbing reproduction bearing in mind that the volume of inoculation was 15 % of the volume of work of biorreactor.¹³

The obtained results there was demonstrated that four concentrations different from flour of soybean the one that it induces to the production of *Bacillus thuringiensis* in 4 different tests that were realized at 0 a.m., 4, 8 and 24 hours of the time of inventory, by a speed of agitation of 500 RPM, ph that it ranges between the 6.18 to 7.28 to a temperature of 30°C it was of 100ppm.

There realized the test of the efficiency of the bioinsecticida based on flour of soybean in insects larvas of the order dípteral and coleopterous to the conditions of work, ph of 6.8, density of the water 0.9 gr/cm³, temperature of the water 29°C, obtaining as result that the bioinsecticida based on flour of soybean killed 90 % of the dípteral insects of the order and 99,9 % to the order coleopterous, both in larval condition, in periods of 1, 8 and 24 hours of monitoring.

The concentration that originated major production of *Bacillus thuringiensis* was of 100 ppm, obtaining $5,0057500 \times 10^7$ UFC/ml in a time of 24 hours, then later tests were realized with 200ppm and 300ppm demonstrating that the presence of *Bacillus thuringiensis* is more well-known, therefore it is possible to say that if it should be realized by 400ppm or 500 ppm it would exist higher productions, there is corroborated and demonstrates that the flour of soybean has insecticide efficiency and is observed that to major concentration of flour of soybean the insecticide efficiency increases, if there had practised

the insecticide efficiency of the flour of soybean to a major concentration of 500 ppm the results in the muerte of the insects larvae of the order dipteran it had increased, diminishing the time of death of these insects larva.

The present work of investigation demonstrated that the instigador (flour of soybean) facilitated the growth and production of *Bacillus thuringiensis*, observing high productions of $4,3112500 \times 10^7$ UFC/ml and $5,0057500 \times 10^7$ UFC/ml of this microorganism at 24 after 8 hours of the time of inventory to a speed of agitation of 500RPM.

Key words: Bioinsecticida, Insecticides, Pollution, Environment.

INTRODUCCIÓN

Las especies de insectos propias de un lugar que alcanzan niveles altos de daño en cultivos locales se conocen como plagas nativas, y aquellas que se originan en otro lugar geográfico, como exóticas. Los enemigos naturales también pueden ser nativos o exóticos.¹³

Un ejemplo importante de control de malezas exóticas lo representa el control de *Opuntia* spp. (Cactaceae). Esta especie nativa en el Nuevo Mundo, se convirtió en un plaga seria en los pastizales del Viejo Mundo y Australia, donde el clima y la ausencia de herbívoros favoreció su dispersión y abundancia. Esta maleza se ha controlado en muchos países mediante la introducción de insectos benéficos (fitófagos), como *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera pyralidae).¹³

Una especie de enemigo natural puede resultar para controlar la plaga en una parte del área y otro agente puede ser más importante en otra área. Por ejemplo, la introducción de la avispa parasitoide *Aphytis melinus* (Hymenoptera: Aphelinidae) es el principal agente controlador de la escama roja

Aonidiella aurantii (Homoptera: Diaspididae) en las condiciones más extremas de clima.¹³

En el cultivo de la papa, tanto la planta como los tubérculos son infestados por diversos insectos que destruyen la planta, durante su permanencia en el campo, y el tubérculo, una vez cosechado. A su vez, hongos como *Beauveria* spp., *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* y *Paecilomyces* spp., son comunes en el campo. Estos hongos tienen un amplio rango de hospedantes y han sido utilizados para controlar diversas plagas en diferentes lugares. En el Perú se ha trabajado en programas para el control del gorgojo de los Andes principalmente. También se han controlado nematodos utilizando *Paecilomyces lilacinus*.¹⁴

El control de plagas que afectan a los cultivos agrícolas es uno de los problemas de contaminación ambiental más severos para nuestro recurso agua, suelo y aire, la utilización de insecticidas está ocasionando desequilibrios en nuestros ecosistemas. Recientemente se ha dado un gran impulso al uso de microorganismos en el control de plagas, debido a que el uso indiscriminado de los insecticidas ha ocasionado la contaminación de la gran mayoría de nuestros recursos naturales. El control Biológico de plagas puede especificar como el uso de organismos naturales: Virus, bacterias, hongos, protozoarios y nemátodos, para el exterminio de insectos que afectan los cultivos. Existen aproximadamente más de 1500 microorganismos o metabolitos microbianos que poseen propiedades insecticidas. El potencial del uso de estos organismos se debe a su alta especificidad, es decir que afectan sólo a los insectos y no causan daño al medio ambiente.¹²

Bacillus thuringiensis, es un habitante normal del suelo, es un componente importante en el control biológico. Es una bacteria Gram positivo, que

se caracteriza por la producción de varias proteínas con capacidad insecticida al ser ingerido por larvas susceptibles específicamente orden lepidóptero, coleóptero y díptero.³

Actualmente existen varios productos comerciales a base de *Bacillus thuringiensis* cuyo ingrediente activo insecticida es una proteína llamada deltaendotoxina, liberada durante la esporulación. Las deltaendotoxinas actúan sobre las microvellosidades del epitelio intestinal de larvas susceptibles, causándoles la muerte del insecto. El *Bacillus thuringiensis* es una buena alternativa debido a que es inocuo al hombre, animales domésticos, flora y fauna silvestre; es específico al estado larvario de lepidópteros, coleópteros y algunos dípteros perjudiciales, por último los costos de producción lo hace competitivo debido a los avances tecnológicos frente a los insecticidas químicos.¹⁵

La fermentación de *B. thuringiensis* se lleva a cabo normalmente a una temperatura entre 27°C y 33°C, siendo la temperatura óptima de 30°C. A 45°C se produce una disminución en la producción de este organismo. Es esencial una fuente inductor para la producción de este microorganismo, la literatura reporta que la Harina de Soja es la fuente preferida para el *B.t* debido a que ésta contiene 40% de proteínas.⁴

El presente proyecto de investigación consistió en evaluar la producción del *Bacillus thuringiensis* de cuatro concentraciones diferentes de Harina de Soja, para el patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100ppm, teniendo en cuenta los parámetros de temperatura, velocidad de agitación y pH, para seguidamente probar la efectividad del microorganismo como bioinsecticida en dos grupos de insectos de orden dípteros y coleópteros.

MÉTODO DE LA INVESTIGACIÓN

El método de la Investigación es Experimental, Según el Beatriz Arquer Palomino, Ana Berzosa Alonso, Noelia García Muños y Miriam Monja Morales (2009). y se desarrollará en tres etapas y estas consisten en:

ETAPA 1: GABINETE INICIAL

En la presente etapa se realizarán las siguientes actividades:

- Se realizaron los trámites respectivos para obtener el permiso donde se ejecutará el desarrollo del proyecto, Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto.
- Recopilación de información bibliográfica de revistas, artículos, libros, etc. necesaria para el desarrollo del proyecto.
- Adquisición del cultivo de *Bacillus thuringiensis*, cedidos por parte del ICT, a través de la Universidad nacional de México.
 - Diseño y elaboración de 4 Biorreactores y de las paletas Rushton.

ETAPA 2: LABORATORIO

En la presente etapa se realizarán las siguientes actividades:

- Preparación y esterilización de los materiales a utilizar, incluido los 4 Biorreactores.
- Reactivación del *Bacillus thuringiensis* con el Agar Nutritivo.
- Siembra del *Bacillus thuringiensis* en dos (02) placas petris por medio de la técnica de estría con el asa de drigalski.
- Preparación de Solución Salina Fisiológicamente Estéril (SSFE) en 3 tubos de ensayos de 10 ml y otro tubo de ensayo completamente vacío.
- De los tres (03) tubos de ensayos que contienen SSFE se agregó 10ml a dos (02) placas petris y del tercer tubo restante se colocó 5ml para cada placa, obteniendo como resultado 15ml en las dos (02) placas.
- A continuación, se sembró de las dos (02) placas petris a un cuarto tubo de ensayo de 30ml y éste se llevó a esterilizar de 4°C a 5°C.

- Se procedió a preparar el medio mínimo de Davis que fue de 600ml para los cuatro (04) Biorreactores, obteniendo un total de 2400 ml del medio.
- Luego a ello se preparó el inóculo con el caldo nutritivo que fue de 300ml en cuatro (4) matraces y se agregó 2ml del cuarto tubo de ensayo a cada uno de los cuatro matraces y se llevó a esterilizar por 24 horas a 37°C.
 - Se pesó la Harina de Soja que fue de 60ppm, 80ppm y 100ppm y se llevó a esterilizar en horno por 24 horas.
 - Como resultado se obtuvo cuatro Biorreactores, patrón, 60ppm, 80ppm y 100 ppm y se agitaron (0, 4, 8 y 24) horas, con una agitación de 400 RPM y 500 RPM.
 - A las 48 Horas transcurridas, con todos los materiales esterilizados se realizó el vertimiento de los 1200 ml del caldo nutritivo en los cuatro Biorreactores, igualmente se hizo con el medio mínimo de Davis que fue de 2400ml y se colocó las tres diferentes concentraciones (60,80 y 100) ppm más el patrón, el cual no contenía concentración alguna de la Harina de Soja.
 - Luego se extrajo cuatro muestras de 30 ul (0,03ml) del patrón, 60ppm, 80ppm y 100 ppm y se llevó a observar el microscopio con la ayuda de la Cámara de Neubauer-improved para el recuento.
 - Por último, se realizó el recuento del patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100ppm de Harina de Soja en un microscopio de 10x por periodo de 3 días.
 - Para finalizar se realizó la prueba de la efectividad del bioinsecticida a base de harina de soja en insectos del orden dípteros y coleópteros.

ETAPA 3: GABINETE FINAL

En la presente etapa se realizarán las siguientes actividades:

- Presentación, interpretación y sistematización de resultados.
- Elaboración del informe y presentación del mismo.

RESULTADOS.

Se probó las diferentes concentraciones de Harina de Soja Residual, patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100ppm, de los cuales se obtuvieron los siguientes resultados; se realizó la evaluación de la agitación, temperatura y el control del pH y se observó que la agitación está relacionada a la velocidad que ejerce la Paleta Rushton en RPM.

Resultado de Análisis- cuarto ensayo (24 Horas).



Gráfico 5: Comparación de producción de B.thuringiensis-Cuarto ensayo del Patrón, 60ppm, 80ppm y 100 ppm a 24 horas.

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Resultado de Análisis-Promedio.

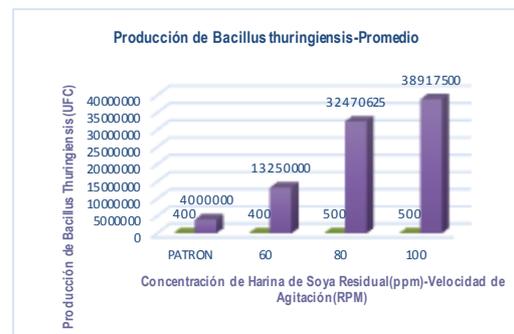


Gráfico 6: Comparación de producción de Bacillus thuringiensis-promedio del Patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100 ppm.

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Recuento en cámara Neubauer.

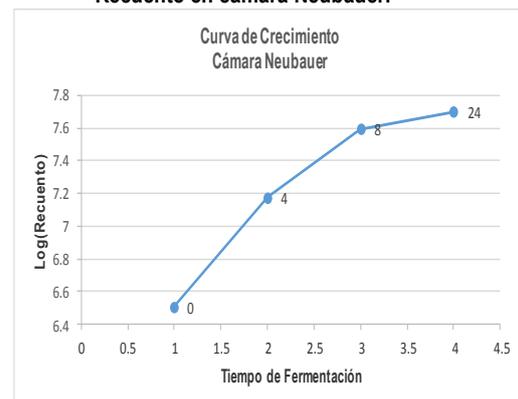


Gráfico 7: Curva de Crecimiento de las 4 concentraciones, Patrón (0ppm), 60ppm, 80ppm y 100ppm a las 0,4,8,24 horas del tiempo de recuento y a 4 horas del tiempo de fermentación, a 7.69 Log (Recuento).
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

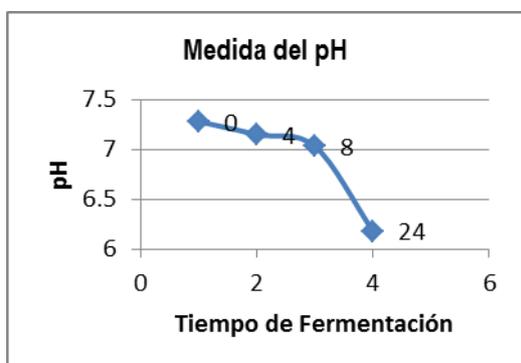


Gráfico 08: Evaluación del pH, obteniendo 6,18 a las 24 horas de recuento.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Se observa que el pH ha disminuido hasta T8. A partir de este tiempo fue disminuyendo hasta llegar a 6.18 que fue cuando culminó el proceso de fermentación.

Discusión

En los cuatro ensayos realizados de las concentraciones, patrón (0ppm), 60ppm y 80 ppm, a las (0, 4, 8 y 24) horas de tiempo de recuento, con una agitación de 500 RPM se obtuvo que en las tres últimas concentraciones (60, 80, 100)ppm produjeron mayor cantidad de *Bacillus thuringiensis* en UFC/ml, obteniendo así que a mayor concentración de Harina de Soja mayor producción de este mencionado organismo, con respecto al patrón (0ppm) también existió la presencia de esta bacteria sin existir concentración alguna de Harina de Soja, en este sólo existió el medio mínimo de Davis, ver gráficos 2, 3, 4, 5. La concentración que originó mayor producción de *Bacillus thuringiensis* fué de 100 ppm, obteniendo $5,0057500 \times 10^7$ en 24 horas, luego se realizaron posteriores ensayos con 200ppm y 300ppm evidenciando que la presencia de *Bacillus thuringiensis* es más notoria, por lo tanto se puede decir que si se hubiera realizado con 400ppm o 500 ppm existiría mejores resultados, según Vargas V.F (2010), la Harina de Soja contiene 40% de proteínas,

siendo éste el inductor esencial de producción del *Bacillus thuringiensis* (ver gráfico 1).

En el análisis promedio de los cuatro diferentes ensayos a las 0, 4, 8 y 24 horas del tiempo de recuento de producción de *Bacillus thuringiensis* se vuelve a demostrar al igual que en el ítem anterior, que a mayor concentración de Harina de Soja mayor producción de *Bacillus thuringiensis*, obteniendo que a 100 ppm se produjo $3,891500 \times 10^7$ UFC/ml, gráfico 6; según Vargas V.F (2010), la Harina de Soja contiene 40% de proteínas, siendo éste el inductor esencial de producción de *Bacillus thuringiensis* (ver gráfico 1).

De los gráficos 2, 3, 4, 5 y 6 se obtuvieron que el patrón en el cual no existió concentración alguna de harina de soja pero si existió medio mínimo de Davis la producción de *Bacillus thuringiensis* fué menor que en el resto de las concentraciones, obteniendo que a las 24 horas del tiempo de recuento se obtuvo $4,750000 \times 10^6$ UFC/ml a una velocidad de agitación de 500 RPM, Según William (2010) el medio mínimo es un medio de cultivo que contiene los nutrientes mínimos indispensables para el crecimiento de una colonia, por lo general sin la presencia de aminoácidos, pero según Vargas V.F (2010), la Harina de Soja contiene 40% de proteínas, siendo éste el sustrato esencial que origina la producción del *Bacillus thuringiensis*.

Con respecto a la velocidad de agitación se realizó a 500 RPM obteniendo resultados óptimos para la producción del *Bacillus thuringiensis* y de acuerdo a otros autores señalan que a 400 RPM y 600 RPM en reactores de 14 litros la producción de este microorganismo es masivo según Camacho. C (2012), y el presente proyecto se realizó a 500 RPM, este valor se encuentra dentro del rango propuesto por Camacho, obteniendo resultados significativos en la producción de este microorganismo.

El pH es un parámetro físico-químico importante durante el proceso de producción. Es por ello, que iniciando el proceso se debe ajustar el medio a un pH entre 6,8-7,2 que es el rango de pH óptimo para este microorganismo. Luego, el pH baja después de 8-12 horas (Orietta, 2002). Esto concuerda con nuestros resultados que el pH empezó a bajar progresivamente. Sin embargo, hay que tener en cuenta que un pH cercano a 5 puede inhibir el proceso de desarrollo de esta bacteria, y de acuerdo a los resultados obtenidos, el pH fue de 6,18 a las 24 horas del tiempo de recuento, el descenso del pH se debe a que cuando el cristal proteínico es ingerido por un insecto susceptible en fase larvaria llega a su intestino medio, se disuelve por la acción de los jugos intestinales ocasionando que el pH descienda.

La temperatura a la que se tuvo expuesto el *Bacillus thuringiensis* fue de 30° C, ajustándolo con un termostato, ello permitió y/o facilitó la producción de este microorganismo a diferentes concentraciones, según Dulmage (1981) el rango de temperatura óptimo para la mayor producción de *Bacillus thuringiensis* ocurre de 28-30°C y ello concuerda con el presente trabajo de investigación.

El tiempo de recuento para la producción de *Bacillus thuringiensis* fué de 0, 4, 8 y 24 horas, si se hubiera realizado con un tiempo de recuento mayor de 24 horas, es decir 48 horas o más, se hubiera obtenido producciones altas de *Bacillus thuringiensis*, según Tapia (2012) a mayor tiempo de recuento se obtendrá mejores resultados de producción de este microorganismo y a su vez se podría graficar la curva de crecimiento con mayor facilidad.

De los resultados alcanzados (ver tabla 11), se realizó la prueba de la efectividad del bioinsecticida a base de harina de soja a 100ppm, 200ppm y 300ppm, se corrobora y demuestra que el

bioinsecticida a base de harina de soja posee eficacia insecticida y se observa que a mayor concentración de harina de soja la efectividad insecticida aumenta, si se hubiera ensayado la efectividad insecticida de la harina de soja a una concentración de 500 ppm los resultados en la muerte de los insectos larva del orden dípteros y coleópteros hubiera aumentado, disminuyendo el tiempo de muerte de estos insectos en estado larvario.

CONCLUSIÓN

La concentración de Harina de Soja que produjo mayor producción de *Bacillus thuringiensis* en los cuatro ensayos fue de 100ppm en los 0, 4, 8 y 24 horas del tiempo de recuento a 500 RPM, a las 24 horas se produjo $5,057500 \times 10^7$ UFC/ml y en los análisis promedio se obtuvo $3,89175500 \times 10^7$ UFC/ml (ver gráfico 2, 3, 4, 5, 6).

El inductor (harina de soja) facilitó el crecimiento y producción de *Bacillus thuringiensis*, observando producciones altas de $4,3112500 \times 10^7$ y $5,0057500 \times 10^7$ de este microorganismo a las 8 y 24 horas del tiempo de recuento, comparado con el obtenido con el medio patrón (Medio Mínimo de Davis) originando la producción más baja de *Bacillus thuringiensis* en los cuatro diferentes ensayos (ver gráfico 2, 3, 4, 5 y 6).

Los resultados del análisis del diseño experimental, demostraron que la influencia de las variables de pH y temperatura para la producción de *Bacillus thuringiensis* son: control de pH de 6,18, y la temperatura de 29° C (ver tabla 7).

El Tiempo mínimo para la producción de *Bacillus thuringiensis* fue de T24 horas (ver gráfico 7).

De acuerdo a los resultados obtenidos (Gráfico 5) se obtuvo que la producción de *Bacillus thuringiensis* a una concentración de 100ppm de

Harina de Soja es de $5,0057500 \times 10^7$ UFC/ml, se concluye que la harina de soja es un sustrato que induce la producción de este microorganismo, de acuerdo a la literatura, la harina de soja contiene el 40 % de proteínas, siendo éste una fuente inductor de producción del *Bacillus thuringiensis*.

La efectividad bioinsecticida a base de harina de soja a 100ppm, 200ppm, 300ppm resultó ser óptima, obteniendo el 90% de muertes de insectos del orden dípteros en estado larvario y de orden coleópteros un 99.9 % en un periodo de tiempo de 24 horas.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.

1. Beltrán L et al (2012) "Estrategia para el diseño de un medio de cultivo para la fermentación con *Bacillus*".
2. Cerdán, Willian Blas. «Producción de biomasa de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis mutante en un medio fermentativo a base de sanguaza.» 31 (2011).
3. Cabrera, Bertha. «Control biológico Evaluación de cepas de *Bacillus thuringiensis*.» Fitosanidad, 2009: 83-87.
4. Escobar, Jenny M. «Análisis exploratorio para la optimización de un medio de cultivo para la fermentación de *Bacillus thuringiensis*.» 2004 (2004).
5. Ruiz de Escudero, I. Ibañez, I. Padilla, M.A. Carnero, A. Caballero, P. «Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de " *Bacillus thuringiensis*" procedentes de muestras de tierra de Canarias.» Bol.San.Veg.Plagas., 2004: 703-712.
6. Sauka, Diego H. «*Bacillus thuringiensis*: Generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas.» Revista Argentina de Microbiología, 2008: 124-140/124-140.
7. Maduell Soler, Pau. «Estudio de la ecología de *Bacillus Thuringiensis* en la hoja.» 2007: 96.
8. Ruiz de Escudero IIPMACACP. Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de " *Bacillus thuringiensis*" procedentes de muestras de tierra de Canarias; 2004.grado Td.: 1-87; 2009.
9. Cabrera Mdcc. Producción de *Bacillus thuringiensis*: 1-87; 2009.
10. Orietta, 2002.Medios de cultivos óptimos para el crecimiento del Bt.pdf.
11. Vargas V.F. (2010).Producción de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis utilizando espárrago (*Asparagus officinalis*) y su uso potencial para el control de la Malaria en la Libertad- Perú.
12. Noticiero de Desarrollo Tecnológico en Alimentos. Editado por: PUAL. Número 3-1991. Universidad Nacional Autónoma de México.
13. Estrada, Clara Inés Nicholls. «Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico.» Ciencia y Tecnología, 2008: 1-200.
14. Ames, Verónica Cañedo Teresa. Manual de laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima: Centro Internacional de la Papa, 2004.
15. Camacho, Carolina Abarca. «Optimización del proceso de fermentación para producir *Bacillus thuringiensis* Var. Aisawai.» Centro de Investigación en Biotecnología, 2012: 1-6.
16. Méndez, Nancy Patricia Chaves. Utilización de bacterias y hongos endofíticas para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorn. Tesis para Maestría, Costa Rica: Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación, 2007.
17. Harina de soja. 18 de octubre de 2016. http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_pie nsos/harina-de-soja-44-pb (último acceso: martes de octubre de 18).
18. Moreno, Edna Elisa Ponce. "Recuperación de Cepas HD de *Bacillus thuringiensis*. Tesis, México: Universidad Autónoma de Nuevo León, 2005.

ANEXOS

Anexo 1

Secuencia de cálculos para diseño del Biorreactor.

Valores de referencia.

1. Viscosidad fluido (kg/m.s) : Vf=0,001-0,040.
2. Densidad fluido (kg/m³) : Df=900-1200.
3. Volumen biorreactor (m³) : VB=0,001-500.(tomada 0,002 m³)
4. Relación altura/diámetro : HD=1-5(tomada 1).
5. Rpm del agitador : N=1-1200
6. Eficiencia del motor(%) : EF=50-95

Cálculos para el dimensionamiento del Biorreactor.

- **Cálculo de la altura.**

Donde:

h: altura del Biorreactor (cm).

V: volumen (m³).

r: radio del fermentador (cm).

Donde asumimos un volumen de 2 litros y un diámetro del reactor de 12 cm.

$$v = \pi r^2 h_u$$

$$h_u = \frac{v}{\pi r^2}$$

$$h_u = \frac{0.002m^3}{(3.141516)(0.06)^2}$$

$$h_u = 18cm$$

- **Altura de seguridad.**

Donde:

hu: altura del fermentador (cm).

hs: altura de seguridad (cm).

$$hs = (hu)(30\%)$$

$$hs = (18cm)(30\%)$$

$$hs = 5.4cm$$

- **Altura total del reactor.**

Donde:

HT: altura total (cm).

hu: altura del fermentador (cm).

hs: altura de seguridad (cm).

$$HT = hu + hs$$

$$HT = 23.4 \text{ cm}$$

- **Cálculo de la presión total.**

Donde:

P= Presión total.

P₀= Presión de operación.

P_S= Presión de seguridad.

$$P = P_0 + P_S$$

$$P = 10.64 \text{ psi} + 1.6 \text{ psi}$$

$$P = 12.25 \text{ psi}$$

La presión de operación P₀ en nuestro caso es la presión atmosférica.

La presión de seguridad es el 80% de la presión atmosférica.

Sistema de Agitación.

- **Altura del agitador.**

Dónde:

L = Altura del agitador (cm).

Øt= Diámetro del cilindro (cm).

$$L = (1.86)(\text{Øt})$$

$$L = (1.86)(12 \text{ cm})$$

$$L = 22.32 \text{ cm}$$

- **Longitud del brazo.**

Dentro del sistema de agitación el rodete crea un modelo de flujo en el sistema, dando lugar a que el líquido y nuevamente retorne al rodete.

Dónde:

Lb= Longitud del brazo (cm).

Øt= Diámetro del cilindro (cm).

$$Lb = \frac{10}{11\tau}$$

$$Lb = 10.9cm$$

- **Diámetro del Rodete.**

No existe una relación fija para el espesor del rodete generalmente varía desde un sexto a un dieciochoavos de la longitud del brazo.

Donde:

Er = Espesor del rodete (cm).

Lb= Longitud del brazo (cm).

$$Er = \frac{10}{18}Lb$$

$$Er = 6.05cm$$

- **Distancia entre el fondo del Tanque y el rodete.**

Para que exista una buena mezcla debe existir un espacio adecuado entre el fondo del tanque y el rodete para que todas las corrientes provocadas por la agitación puedan homogenizar completamente el líquido o sólido en el proceso.

Para ello generalmente se tiene la siguiente ecuación:

Dónde:

h_{fr} = Altura del fondo al rodete (cm).

h_u=Altura útil (cm).

$$h_{fr} = \frac{1}{10} h_u$$

$$h_{fr} = 1.8 cm$$

- **Alto de la paleta.**

Dónde:

AP= Alto de la paleta (cm).

Lb= Longitud del brazo (cm).

$$Ap = \frac{1}{12}Lb$$

$$A_p = 0.91 \text{ cm}$$

- **Diámetro utilizado por la paleta.**

Donde:

A_p : Diámetro utilizado por la paleta (cm).

$\emptyset t$: Diámetro del cilindro (cm).

$$D_p = \frac{6}{7} \emptyset t$$

$$D_p = 10.29 \text{ cm}$$

- **Cálculo de la Viscosidad.**

$$\mu = 2g \frac{(\delta_{sol} - \delta_{Liq})r^2}{(9)(v)}$$

Donde:

μ = Viscosidad

g = Gravedad

$\delta_{Sólido}$ = Densidad del sólido.

δ_{Liq} = Densidad de la mezcla.

r = Radio de la esfera.

v = Velocidad de recorrido de la esfera.

$$\mu = 2(9.8 \frac{m}{s^2}) \frac{\left(1046 \frac{kg}{m^3} - 1036 \frac{kg}{m^3}\right) (0.06)^2}{(9) \left(0.15 \frac{m}{s}\right)}$$

$$\mu = 0.52 \frac{kg}{ms}$$

- **Cálculo del número de Reynolds.**

Donde:

D_i : Diámetro del agitador.

N_i : Velocidad de rotación del agitador en rps.

δ : Densidad.

μ : Viscosidad.

$$Re = \frac{(Di)^2(N)(\delta)}{\mu}$$
$$Re = \frac{(0.12m)^2(8.33s)(1036 \frac{kg}{m^3})}{0.52}$$
$$Re = \frac{(0.12m)^2(8.33s)(1036 \frac{kg}{m^3})}{0.52 \frac{kg}{ms}}$$
$$Re = 1991.5$$

- **Cálculo del gradiente de temperatura aritmético.**

Donde:

ΔT = Gradiente de temperatura aritmética.

TF = Temperatura ideal del biorreactor.

Te = Temperatura de entrada.

Ts = Temperatura de salida.

$$\Delta T = \frac{2TF - (Te + Ts)}{2}$$

$$\Delta T = 0.5^\circ C$$

- **Tiempo de Residencia o Tiempo espacial.**

Tiempo empleado por un elemento de fluido en recorrer el sistema desde la entrada a la salida.

$$TR(\text{min}) = \frac{V_{\text{Reactor}}(\text{Ml})}{\vartheta_{\text{Entrada}}(\frac{\text{Ml}}{\text{Min}})}$$

Donde:

TR = Tiempo de Residencia.

V_{Reactor} = Volumen de biorreactor.

$\vartheta_{\text{Entrada}}$ = Caudal de entrada en el biorreactor.

$$\vartheta = (V)(A)$$

$$\vartheta = 0.0004(\frac{m^3}{s})$$

$$V = \frac{d}{T} \quad A = 0.01 \text{ m}^2$$

$$V = \frac{0.2 \text{ m}}{5 \text{ S}} \quad \vartheta = 24000 \left(\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right)$$

$$V = \frac{0.04 \text{ m}}{\text{S}}$$

$$\Rightarrow \text{TR}(\text{min}) = \frac{2000 \text{ (Ml)}}{2400 \left(\frac{\text{Ml}}{\text{Min}} \right)}$$

$$\text{TR}(\text{min}) = 0.83 \text{ min}$$

Calcular la Velocidad de Reacción.

V (Volumen Biorreactor) = 2 litros.

Alimentado con 1 L por minuto de Medio Mínimo de Davis.

Reactivo $CA_0 = 0.10 \text{ mol/ litro}$.

Corriente Salida $CA_f = 0.02 \text{ Mol/ litro}$.

$V=v$

$$-r_{A=} \frac{CA_0 - CA_f}{\tau}$$

$$-r_{A=} \frac{CA_0 - CA_f}{V/v}$$

$$-r_{A=} \frac{(0.01 - 0.02) \text{ mol/litro}}{1/1}$$

$$-r_A = 0.08 \text{ mol/litro .min}$$

- **Masa del agua**

$$m = D.v$$

$$m = 1800 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \cdot 0.002 \text{ m}^3$$

$$m_{\text{H}_2\text{O}} = 3.6 \text{ kg.}$$

Anexo 2

Tinción Gram

1. Preparar una extensión de bacteria y fijar suavemente al calor.
2. Aplicar unas gotas de violeta de genciana y bicarbonato de calcio por 01 minuto.
3. Dejar caer la solución anterior para colocar lugol por 01 minuto.
4. Lavar con agua destilada y decolorar con alcohol cetona dejar por 01 minuto.
5. Lavar con agua destilada y aplicar una solución contraste en este caso la Safranina durante 01 minuto.
6. Lavar con agua destilada y secar cuidadosamente con papel y luego suavemente con calor.

Anexo 3

Fórmula aplicada para el cálculo de la Concentración.

Fórmula para Recuento con cuadros grandes en Cámara de Neubauer.

$$\text{Concentración} = \text{Número de Células} \times 10000 / \text{Número de Cuadros.}$$

Anexo 4



Imagen 1: Elaboración de los Biorreactores.

Fuente: Elaboración Propia, octubre-2015.

Anexo 5



Imagen 2: Diseño y elaboración de los Baffles para los Biorreactores.
Fuente: Elaboración Propia, octubre-2016.

Anexo 6



Imagen 3: Elaboración de los Baffles para los Biorreactores.
Fuente: Elaboración Propia, octubre-2016.

Anexo 7



Imagen 4: Biorreactores siendo retirados del autoclave, esterilizados.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 8



Imagen 5: Biorreactores esterilizados.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 9

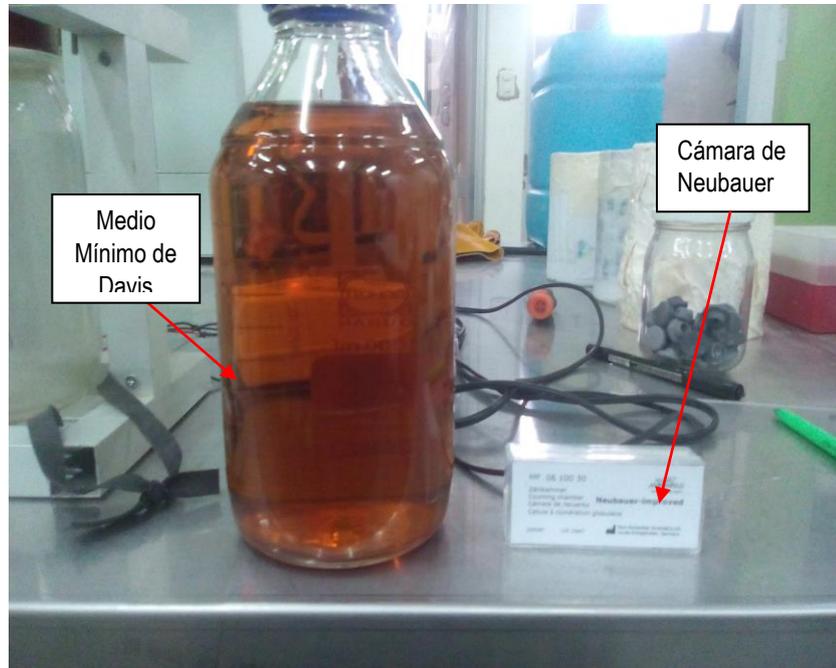


Imagen 6: Medio mínimo de Davis y Cámara de Neubauer.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 10

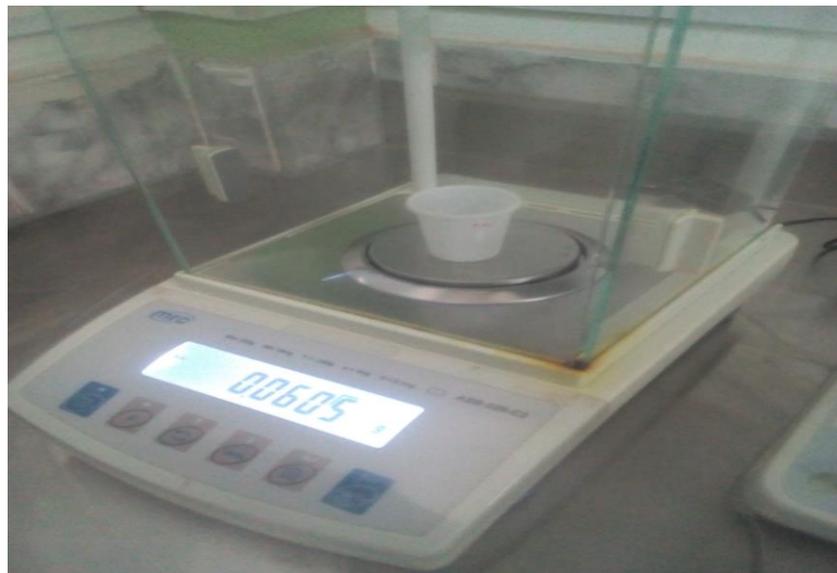


Imagen 7: Pesado de la Harina de Soja.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 11

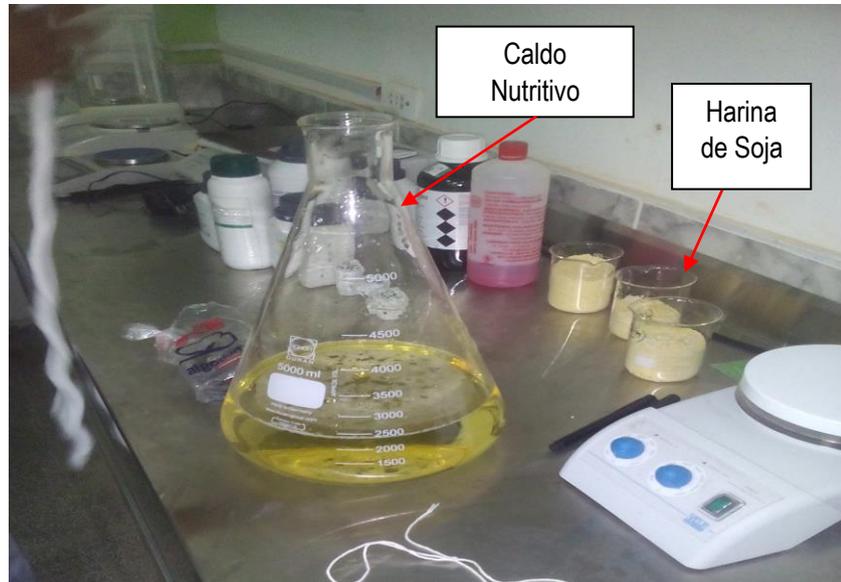


Imagen 8: Caldo nutritivo.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 12

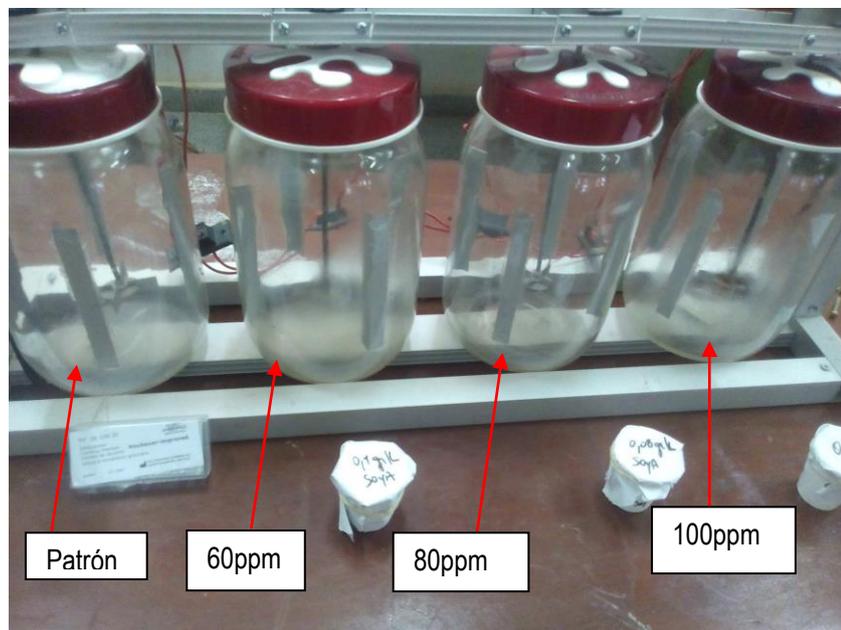


Imagen 9: Preparación de materiales e insumos a utilizar en los Biorreactores.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 13



Imagen 10: Vertimiento del Caldo nutritivo, Medio mínimo y Harina de Soja en diferentes concentraciones.

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 14



Imagen 11: Ensayos de producción de *Bacillus thuringiensis*.

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 15



Imagen 12: Observación en el microscopio del *Bacillus thuringiensis*.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 16



Imagen 13: Recuento de las células en la Cámara de Neubauer.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 17

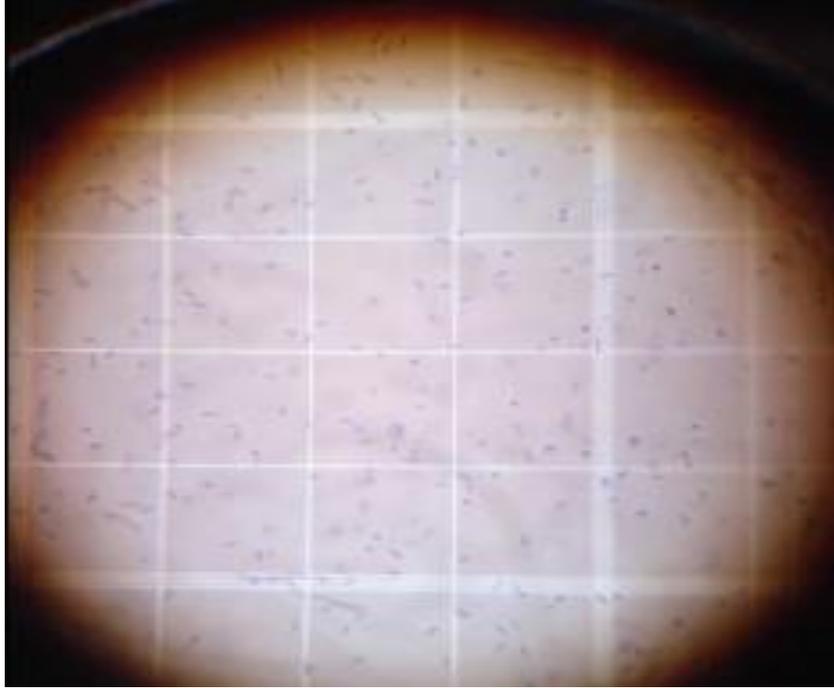


Imagen 14: Recuento de las células en la Cámara de Neubauer.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 18



Imagen 15: Toma fotográfica de ensayo de efectividad de Bioinsecticida.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 19



Imagen 16: Ensayo de la efectividad de Bioinsectida a base de harina de soja en insectos de orden coleópteros y dípteros (estado larvario).
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 20



Imagen 17: Bioinsectidas elaborados a base de harina de soja y melaza de maíz.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 21



Imagen 18: Ensayo de bioinsecticidas a base de harina de soja y melaza de maíz.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 22



Imagen 19: Bioinsecticida a base de melaza en coleópteros-8 horas en insectos.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 23



Imagen 20: Bioinsecticida a base de harina de soja en insectos de coleópteros- 1 hora.

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 24



Imagen 21: Efecto de bioinsecticida a base de harina de soja en insectos larvas de dípteros-8 horas.

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 25



Imagen 22: Efecto de bioinsecticida a base de melaza de maíz en insectos larvas de dípteros-24 horas.

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 26

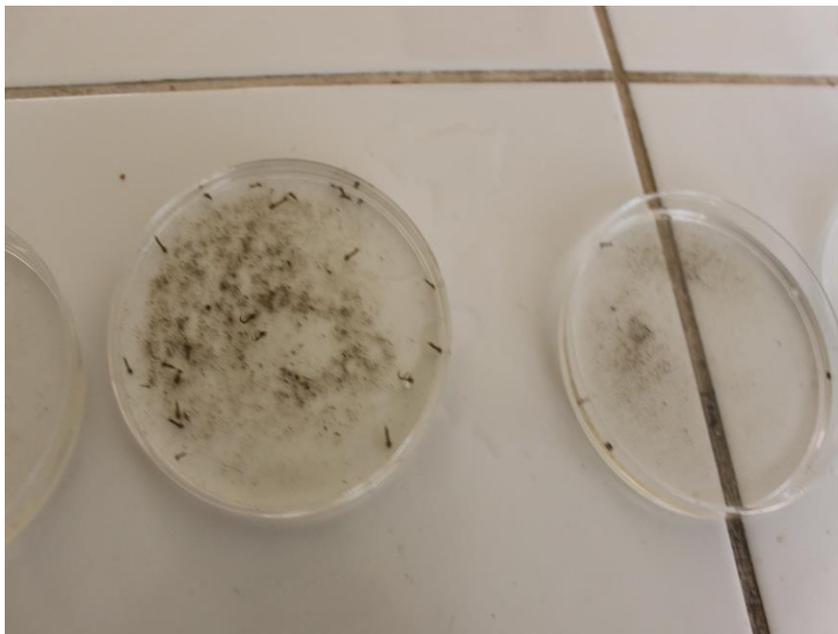


Imagen 23: Efecto de bioinsecticida a base de harina de soja en insectos larvas de dípteros-24 horas.

Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 27



Imagen 24: Vista macroscópica de insecto larva de orden díptero.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 28



Imagen 25: Prueba de la efectividad de ambos bioinsecticidas en insectos de orden dípteros- 24 horas.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 29



Imagen 26: Medición de la temperatura del agua.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 30



Imagen 27: Medición de la densidad del agua.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 31

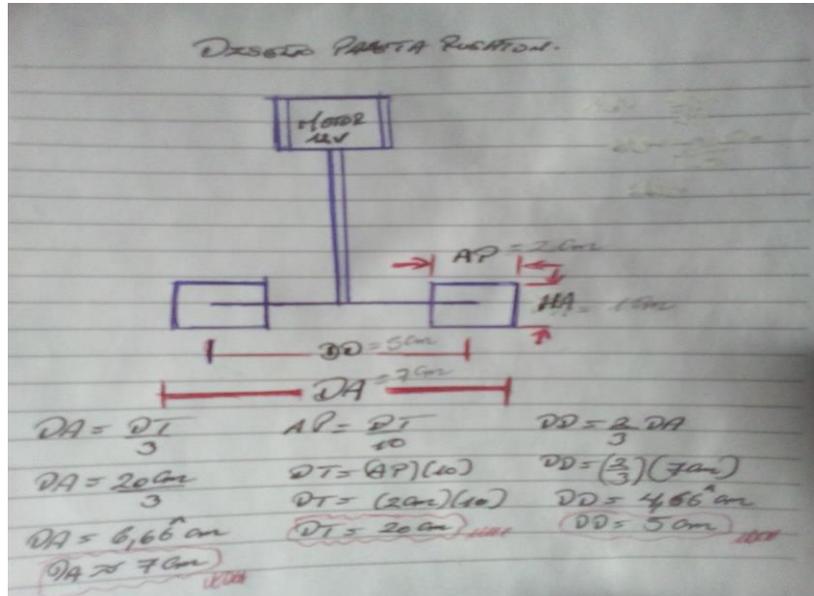


Imagen 28: Diseño de las Características Geométricas de la Paleta Rushton.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 32

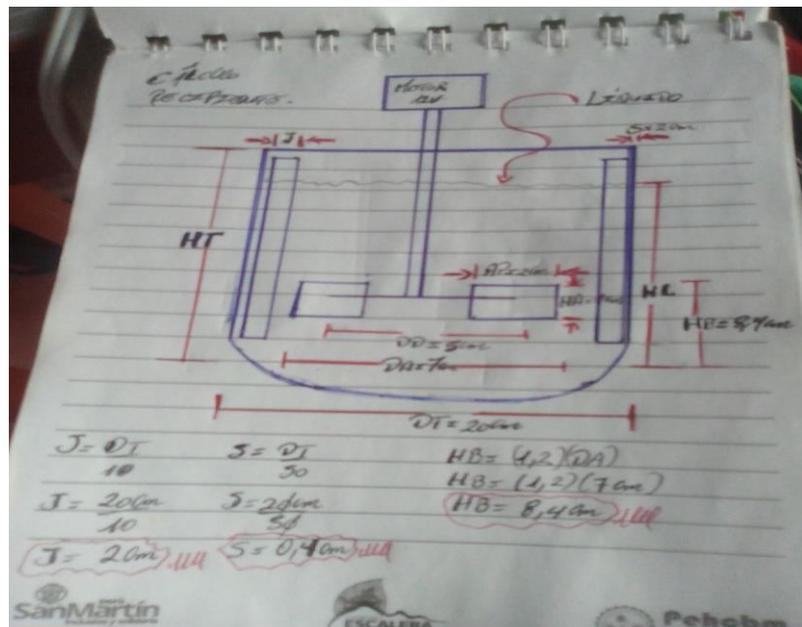


Imagen 29: Diseño de las Características Geométricas del Biorreactor.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 33



Imagen 30: Toma de datos de los ensayos del efecto bioinsecticida-1hora.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.

Anexo 34



Imagen 31: Toma de datos de los ensayos del efecto bioinsecticida-8 horas.
Fuente: Elaboración Propia, 2016.