

*Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”.*

*Facultad de Ingenierías Química y Mecánica.*

*Carrera: Ingeniería Química.*



## *Trabajo de diploma*

***Título:*** *Análisis del control de calidad en el proceso de obtención de biopreparados en la Empresa Fitosanitaria Provincial de Matanzas.*

***Autor:*** *Mohamed Siby.*

***Tutora:*** *MSc. Irina Pedroso Rodríguez*

***Matanzas, Junio de 2010***

# *NOTA DE ACEPTACIÓN*

---

---

---

---

---

Presidente del tribunal

---

Miembro del tribunal

---

Miembro del tribunal

Ciudad de Matanzas, .....de.....del 2010

## *Declaración de Autoridad.*

Declaro que yo MOHAMED SIBY soy el único autor de este Trabajo de Diploma en opción a la ingeniería química y autorizo a la universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos” a utilizar el mismo con la finalidad que estime conveniente.

---

MOHAMED SIBY

## *Dedicatoria*

Dedico este trabajo así como mi vida muy especialmente a mi Papá Sekou Siby.

A mi Mamá Adama Keita que me ha ayudado con su esfuerzo y dedicación de cerca o de lejos.

A mi tía Aissata Siby por su dedicación y apoyo.

A mi Hermana Hadja Medine Siby por su dedicación y apoyo.

A mi novia Maite Abreu Cardona por su dedicación y apoyo incondicional, a su familia.

A mi hermano Ansoumane Camara por su dedicación y apoyo incondicional.

A mis amigos y amigas de todos los tiempos, Hermann Nkombe, Mohamed Sefa Sylla, Thomas Bangoura, Mohamed Ruben Bah, Mohamed Rahim Camara, Elhadj Amadou Oury Barry, Amadou Babahien Camara, Mayelín García, Ernest Lama, Koffi, Edem, Ibrahim Kaba, Yaya Kourouma, Boubacar Cisse, Dianka Kaba, presentación Gloriosa Mangué, Celmira gomes, Mamaissata Bangoura, Mohamed Sampil, Mohamed Fadiga, Abdoulaye Bangoura, Zowe, Ibrahim Koker Camara, Yousouf Koker Camara, Pascal Cisse, Daniel Goumou, Mc Donal.

A mi futura familia que algún día he de formar, a mis futuros hijos.

A todos los que he conocido durante estos años de mi vida en que compartimos buenos y malos momentos que son memorables.

A todos los profesores que me han formado como profesional.

A todos aquellos que han hecho posible la culminación de este trabajo.

# *Agradecimientos*

Quiero expresar mi máximo agradecimiento a todos aquellos que me ayudaron en la confección de este trabajo y en especial.

A la revolución cubana por darme la posibilidad de formarme como futuro profesional.

Agradezco especialmente a mi tutora Msc. Irina Pedroso Rodríguez por su dedicación, ayuda desinteresada y apoyo durante la realización de este trabajo. Irina usted siempre estará siempre en un lugar muy especial de mi corazón.

A mi novia Maite Abreu Cardona que en todo momento está siempre en mi lado brindándome su apoyo necesario.

A mi hermano Ansoumane Camara me han inculcado las fuerzas necesarias para lograr mi sueño.

A mis compañeros de aula: Figueredo Fernández, Hermann Nkombe, Eddy de Nazares, Denise Souares, Osmany Marrero, Darién Ortega, Yasmany García, Raidel Vera, Sander González, Adrián Bacallao, Ailenys Santana, Yailén Gómez, Yelenis Pino, por su dedicación de una forma u otra todo este tiempo.

## *Pensamientos*

*“Revolución es..... ser tratado y tratar a los demás como seres humanos...”*

*Fidel Castro*

*“Esta humanidad tiene ansias de justicia”*

*Fidel Castro*

*“Ser culto es el único modo de ser libre”*

*José Martí*

## *Resumen*

La producción de bioplaguicidas en los últimos años se ha incrementado de forma considerable, valorándose todas las vías posibles de obtención. En la Empresa Provincial Fitosanitaria Provincial de Matanzas (Sanidad Vegetal) se obtienen diferentes tipos de microorganismos, siendo los de mayores cantidades el *Bacillus Thuringiensis* (Bt) y el *Trichoderma* (TS3).

En este trabajo se realiza un análisis del control de calidad del proceso de obtención de estos microorganismos, donde se estudian las variables operacionales temperatura y velocidad de agitación y los parámetros de calidad del producto concentración y viabilidad, a través de herramientas estadísticas. Se obtuvo que la velocidad de agitación en los fermentadores no cumple con las especificaciones requeridas. Además, se detecta que existen diferencias significativas en la concentración con respecto a los dos microorganismos.

## *Summary*

Bioplaguicids production has considerably increased over the past years suggesting a consideration about all the possible ways for obtaining it. At the provincial phytosanitary company of Matanzas (Sanidad Vegetal) it is possible to obtain different types of microorganisms among which the Bacillus, the Thuringiensis (Bt) and the trichoderm (TS3) are in larger quantities.

An analysis is carried out in the present work on the control of these microorganisms obtaining process, wherein a study is made about the operational variables temperature and agitation rate as well as the parameters of product quality, concentration and viability, through statistical tools. It resulted from the analysis that the agitation rate in the fermentation agents does not fulfill the required specifications. Besides, some significant differences have been noticed in the concentration in relation with the microorganisms.



Contenido	Página
Introducción	1
<b>Capítulo 1: Fundamentación teórica.</b>	<b>3</b>
1.1 Bioplaguicidas	3
1.2 Bioplaguicida Trichoderma.	9
1.3 Bioplaguicida Bacillos thuringiensis	13
1.4 Bioplaguicida Beauveria bassiana	16
1.5 Materias primas y auxiliares para la producción de bioplaguicidas	18
1.6 Proceso de producción	19
1.7 Control de calidad en procesos.	23
1.8 Conclusiones parciales del capítulo.	23
<b>Capítulo 2: Materiales y Métodos.</b>	<b>24</b>
2.1 Variables analizadas.	24
2.2 Técnicas usadas para determinar las variables que definen la calidad del producto final.	26
2.3 Herramientas estadísticas.	28
2.4 Conclusiones parciales del capítulo	31
<b>Capítulo 3: Resultados y discusión.</b>	<b>32</b>
3.1 Análisis estadístico para las variables operacionales.	32
3.2 Análisis del cumplimiento de las especificaciones de calidad en las variables operacionales.	35
3.3 Comparación de las variables operacionales en dependencia del año y del microorganismo producido.	39
3.4 Determinación de si las variables operacionales se encuentran o no bajo control.	40
3.5 Análisis estadístico para los parámetros de calidad del producto final.	42

3.6 Análisis del cumplimiento de las especificaciones de calidad en los parámetros del producto final.	44
3.7 Comparación de los parámetros de calidad en dependencia del año y del microorganismo producido.	45
3.8 Determinación de si los parámetros del producto final se encuentran o no bajo control.	47
3.9 Conclusiones parciales del capítulo.	47
Conclusiones	49
Recomendaciones	50
Bibliografía	51

## *Introducción:*

Uno de los problemas fitosanitarios en el mundo y en Cuba, es la alta incidencia de plagas, los bioplaguicidas son agentes biológicos, sustancias activas o mezcla de sustancias de origen químico o biológico utilizadas para disminuir, prevenir, combatir, controlar, regular, o repeler la acción de organismos que son plaga en cultivos de importancia agrícola. La salud de las plantas empieza con medidas preventivas. Se sabe que el secreto de vivir y cumplir muchos años en buen estado de salud depende de aspectos genéticos, pero igual tiene que ver la prevención de enfermedad por una buena nutrición, ejercicio, y evitar toxinas que dañan a la salud. También se conoce que el secreto de tener cultivos saludables con pocos problemas de plagas depende de la presencia de condiciones ambientales favorables. La creación de condiciones a las cuales se puedan desarrollar plantas fuertes y sanas es el primer paso de manejo integrado de plagas.

En la empresa Fitosanitaria Provincial de Matanzas (Sanidad Vegetal) se aprovecha los hongos y bacterias en en la obtención de bioplaguicidas, cuyo proceso ocurre en los fermentadores.

En esta planta por la importancia que requiere el proceso se realizan de forma periódica mediciones de las variables operacionales (temperatura, presión y velocidad de agitación) en los fermentadores, además, se determinan los parámetros que definen la calidad del producto final (concentración, pureza, viabilidad y virulencia).

En esta empresa no se ha realizado un análisis de la calidad del proceso de forma integrada, es decir, teniendo en cuenta muestras de las variables operacionales y los parámetros de calidad del producto final.

Basado en lo explicado anteriormente, el *problema de investigación* de este trabajo es el siguiente:

En la Empresa Fitosanitaria Provincial de Matanzas se hace necesario valorar si las variables operacionales y los parámetros de calidad del producto final cumplen con las especificaciones requeridas.

Para dar solución al problema se plantea la *hipótesis de trabajo* siguiente:

Si se aplican herramientas estadísticas, se podrá determinar si en la empresa Fitosanitaria Provincial de Matanzas, las variables operacionales y los parámetros de calidad del producto final cumplen con las especificaciones requeridas.

.Para dar cumplimiento a la hipótesis se traza el *objetivo general* siguiente:

Determinar si las variables operacionales y los parámetros de calidad del producto final cumplen con las especificaciones requeridas en la empresa Fitosanitaria Provincial de Matanzas, a través de herramientas estadísticas.

Los *objetivos específicos* de esta investigación son:

- 1- Realizar una búsqueda bibliográfica sobre temas relacionados con la producción de biopreparados.
- 2- Describir detalladamente el proceso tecnológico de la Empresa Fitosanitaria Provincial de Matanzas.
- 3- Recopilar información de datos de los parámetros de calidad de la Empresa Fitosanitaria Provincial de Matanzas.
- 4- Realizar una caracterización estadística de las variables operacionales y los parámetros de calidad del producto final.
- 5- Aplicar las herramientas estadísticas, pruebas de hipótesis, análisis de varianza y carta de control.

# *Capítulo 1. Fundamentación teórica.*

## **1.1 Bioplaguicidas**

Se denominan biopreparados a las preparaciones con partes de plantas, estiércoles, sales minerales y productos naturales que se aplican en la prevención y en algunos casos en la curación de plagas y enfermedades de las plantas. (Gelernter & Evans, 1999).

Los bioplaguicidas son gusanos microscópicos llamados nematodos en cuyo interior coexiste una bacteria que tiene la capacidad de matar a caracoles y babosas. Por lo tanto, de acuerdo al ciclo vital de los nematodos, éstos buscan a las plagas de caracoles y babosas y penetran en ellos con sus bacterias, mediante aberturas de la piel, causándoles la muerte. Finalmente, los nematodos se reproducen y los nuevos nematodos que nacen se alimentan de los caracoles y babosas muertos para repetir indefinidamente este ciclo. De forma general la estrategia de producción masiva consiste en diseñar un sistema de cultivo de nematodos basado en reactores biológicos, donde se logra optimizar la producción a escalas que hagan rentable la aplicación comercial de los bioplaguicidas. (Copping, 2001)

Cabe et al. en el 2005 definen los bioplaguicidas o plaguicidas biológicos como agentes de origen biológico para el manejo de plagas. Aunque, como se verá más adelante, no hay una sola definición para los bioplaguicidas, siendo una de sus principales características que ellos no son químicos. Consecuentemente son reconocidos ampliamente como aceptables para el ambiente. Sin embargo, el nombre plaguicida, aunque está asociado con métodos biológicos o “naturales” para el manejo de plagas, tiende a dar la impresión de ser derivados de plaguicidas químicos, aunque ellos tengan un modo de acción completamente diferente.

Por esta razón se debe observar cuidadosamente la presentación de las características únicas de los bioplaguicidas, para que los beneficios ambientales reciban el reconocimiento que merecen.

Aunque el término “biológico” proporciona el contexto para el término bioplaguicida, la mayoría de las definiciones utilizadas internacionalmente están ligadas a atributos requeridos para el registro en cada país. Por tal razón hay una tendencia a caer dentro del rango de conceptos asociados con plaguicidas químicos, a los cuales se les ha referido como paradigma químico. (Cabe et al., 2005)

Según el concepto de la Agencia de Protección Ambiental (EPA, 2003): “Los bioplaguicidas son ciertos tipos de plaguicidas derivados de materiales naturales tales como animales, plantas, bacterias y algunos minerales”. La EPA reconoce tres categorías de bioplaguicidas:

1. Plaguicidas microbiales: bacterias, hongos, virus y protozoos.
2. Protectores incorporados en plantas (PIPS), los cuales favorecen la incorporación de genes con propiedades de plaguicida dentro de las plantas.
3. Plaguicidas bioquímicos: sustancias de ocurrencia natural para el control de plagas por medios no tóxicos, por ejemplo, feromonas.

Aquí el énfasis está en materiales naturales como atributo básico. Pero en comparación con otras organizaciones, EPA ha incluido además plantas genéticamente modificadas en las definiciones de bioplaguicidas. Otro componente clave es la aceptación del hecho de que el control de plagas puede lograrse por medios no tóxicos. Pero esta es en realidad un área gris, que no tiene reconocimiento ni definición universal. EPA estableció además un comité para determinar si los plaguicidas deberían ser clasificados como biológicos o convencionales. Adicionalmente los requerimientos de registro para bioplaguicidas tienden a ser abreviados en comparación con los plaguicidas convencionales, y de esa manera acortar el período de registro y reducir costos. (EPA, 2003). En el Anexo 1 se muestra la definición de la Unión Europea (UE) Grupo Legislativo.

- Tipos de bioplaguicidas.

Existen diferentes tipos de bioplaguicidas, a continuación se muestra la definición de algunos de ellos:(*Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Bacillus subtilis*,*Trichoderma* spp).

- *Bacillus thuringiensis* (Bt)

El Bt es una bacteria de tipo esporulante que presenta células vegetativas en forma de bastoncillos más o menos largos que se agrupan en cadenas de dos a tres células. Se caracteriza por formar una espora central o terminal en el esporangio y por la presencia o formación de un cristal proteico.

La bacteria ataca solo larvas de insectos. El ciclo de infección se inicia cuando el insecto ingiere alimento conteniendo esporas o cristales de Bt.

Como consecuencia de la infección se paralizan las partes bucales y el intestino que conduce al cese de la alimentación, regurgitación y diarrea. La larva pierde agilidad y el tegumento toma una coloración marrón oscuro, se torna flácida y sin movimientos y la muerte ocurre entre las 18 y 72 horas tomando una coloración negra.

Los productos comerciales de Bt están recomendados para el control de gusanos o larvas de Lepidópteros, entre ellas, palomilla del repollo, gusanos del fruto, gusano cogollero, gusano de la mazorca del maíz, gusano de la hoja, en cultivos como tomate, repollo, brócoli, coliflor, lechuga, chile, frijol, maíz, etc. Se deben aplicar en estados iniciales o intermedios, ya que en larvas muy desarrolladas, este no es muy efectivo. (López, 2005)

- *Beauveria bassiana*.

Es un hongo entomopatógeno que provoca una enfermedad o produce toxinas que causan la muerte de los insectos, en sus diferentes estados. Su cuerpo está formado por una estructura llamada micelio y produce esporas asexuales llamadas conidios de forma redonda y color blanco o hialino. Los insectos muertos por este hongo presentan

un crecimiento de color blanco. Ataca más de 200 especies de insectos (Coleóptero, Lepidóptero, Hemíptero, etc.).

Las esporas se adhieren al cuerpo del insecto y germinan formando un tubo germinativo y luego ocurre el proceso de penetración mediante acción física del hongo, a través del tubo de penetración y por medio de enzimas que ayudan a digerir la cutícula del insecto. Después de que ha penetrado, alcanza el interior del cuerpo colonizando el tejido mediante producción de blastosporas e hifas. Luego hay producción de toxinas en el interior del cuerpo sobreviniendo la muerte y la colonización total del insecto. Finalmente el hongo emerge hacia el exterior del insecto y esporula sobre el cadáver. (Mantilla, 2004)

Los insectos atacados dejan de alimentarse, reducen su movimiento y luego ocurre la muerte.

En los cadáveres de los insectos atacados, se observa el micelio y las esporas (color blanco) principalmente en áreas menos esclerosadas.

Los productos comerciales a base de *Beauverias* sp., son recomendados para el control de broca del café, picudo de la caña de azúcar, picudo del plátano y banano, pero también han sido usados en plagas de hortalizas como la palomilla del repollo, el picudo del chile y mosca blanca con buenos resultados. Se recomienda hacer una buena cobertura en el cultivo cuando se trata de plagas del follaje, también evitar momentos de los muy soleados ya que el que es afectado por la luz solar. (Mantilla, 2004)

- *Metarhizium anisopliae*

Es un hongo entomopatógeno que produce esporas o conidios de color verde y forma ovalada y los insectos muertos por este hongo presentan un crecimiento de color verde. Al igual que *Beauveria* spp, ataca más de 200 especies de insectos (Coleóptera spp., Lepidóptera spp, Hemíptera spp., etc.).



Las esporas del hongo se adhieren al cuerpo del insecto y germinan formando un tubo germinativo y luego ocurre el proceso de penetración mediante acción física del hongo por el tubo de penetración y a través de las enzimas que ayudan a digerir la cutícula del insecto.

Después que ha penetrado, coloniza el interior del insecto. Luego hay producción de toxinas ocurriendo la muerte y la colonización total del insecto. Finalmente el hongo emerge hacia el exterior del insecto y esporula sobre el cadáver.

Los insectos enfermos detienen su alimentación y reducen su movimiento para finalmente morir. En el cuerpo del insecto muerto, se observa el micelio de color blanco y las esporas (color, verde) principalmente en áreas menos esclerosadas.

Los productos comerciales a base de *Metarhizium* spp., son recomendados para el control de salivazo (*Prosapia* spp.) en caña y pastos, chinches en diferentes cultivos, picudo del plátano y banano, pero también ha sido evaluado en tomate para plagas como la mosca blanca con buenos resultados.

Es recomendable hacer una buena cobertura del producto en el cultivo cuando se trata de plagas del follaje y realizar las aplicaciones en momentos menos soleados. (Hu et al.2002)

- *Bacillus subtilis*

Es una bacteria del suelo muy abundante en la rizosfera de plantas recién germinadas. El ingrediente activo de productos basados en esta bacteria está constituido por la misma bacteria y los metabolitos que produce.

La bacteria se establece en la rizosfera del cultivo tratado y coloniza el sistema radical compitiendo con los organismos patógenos que atacan a ese nivel. Su mecanismo de acción es por antagonismo, el cual es logrado de varias maneras como competencia por nutrientes, exclusión, colonización y unión de la bacteria al hongo patógeno. También puede actuar como inductor de resistencia contra patógenos bacteriales.

Puede detener la germinación de esporas de patógenos de plantas, distorsionar el desarrollo del tubo germinativo e inhibir la unión del patógeno a la hoja.

Esta bacteria se utiliza para el control de patógenos del suelo como *Fusarium* sp, *Pythium* sp y *Rhizoctonia* spp., en cultivos de vegetales, soya, maní y leguminosas. Puede aplicarse en tratamiento a la semilla o en drench sobre el suelo en la base de las plantas. (Carballo, 2005)

- *Trichoderma* spp

Existen varias especies entre ellas *T. harzianum*, *T. lignorum*, *T. viride*. Estos son hongos antagonistas de ocurrencia natural en el suelo que actúan mediante la ruptura de paredes hifales del hongo Fitoparásito, penetrando sus hifas y aprovechando sus nutrientes. A su vez produce toxinas como tricodermin y harzianopeiridona causando antagonismo por fungistasis y también produciendo enzimas líticas que destruyen las paredes celulares de los esclerocios o estructuras de resistencia del hongo. Así mismo, compete por nutrientes y la dominancia de la rizosfera.

Es utilizado para controlar *Phytophthora capsici*, *P. Parasitica*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium* sp., *Fusarium* sp., *Poma* sp., *Sclerotinia* sp., y *Botrytis* sp., en cultivos hortícolas, tomate, chile, papa, melón, ornamentales y otros. (Carballo, 2005)

- *Gliocladium virens*

Es un hongo antagonista de ocurrencia natural en el suelo y su modo de acción es mediante antagonismo a los patógenos del suelo mediante la producción de metabolitos como gliotoxina la cual tiene actividad antifungosa, presentando también un efecto de competencia por nutrientes.

Es utilizado para controlar enfermedades causadas por *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia minor*, *Fusarium oxysporum* en cultivos de vegetales, granos y ornamentales. Puede aplicarse al suelo en semilleros o en campo. (Carballo, 2005)

En este trabajo se estudia los bioplaguicidas: Trichoderma, Bacillos Thuringiensis y Beauveria bassiana, por lo que a continuación se profundiza en conceptos, características, propiedades, procesos de producción, usos, modo de acción etc., de los mismos.

## **1.2. Bioplaguicida Trichoderma.**

### **1.2.1. Concepto de Trichoderma:**

Trichoderma sp. Es un hongo perteneciente a la subdivisión de Deuteromicetes que se caracteriza por no presentar un estado sexual determinado. Se encuentra representado en un número importante de suelos naturales, tanto de origen forestal, como de otros substratos orgánicos cuyo componente principal es la lignina o la celulosa. Ha evolucionado en la naturaleza, en cuanto a la estrategia nutricional pues la competencia con otros microorganismos es muy escasa, por lo que tiene sus limitaciones en momentos puntuales, por ejemplo, cuando existan muchos nutrientes presentes en el suelo, puede verse desplazado por los denominados microorganismos oportunistas, que presentan una capacidad de multiplicación más rápida.(Norte, 2010 )

### **1.2.2 Propiedades.**

La temperatura óptima es de 25°C, pero el valor de crecimiento de trichoderma está entre 15° y 35°C, se debe señalar que fuera de este intervalo de temperatura, este microorganismo se caracteriza por producir formas de resistencia.

Las condiciones de humedad adecuadas están en torno al 70% de la capacidad de retención hídrica, aunque es capaz de crecer entre el 20% y 80%. Es un microorganismo anaerobio facultativo, lo que le confiere la capacidad de actuar tanto en condiciones de aerobiosis (suelos muy porosos), cuyas condiciones son óptimas para su crecimiento, como en medios con elevada actividad microbiana, puntualmente deficientes en oxígeno.

El pH adecuado para su desarrollo se sitúa entre 6 y 6,5, aunque pueden vivir en rangos superiores, pues la mayor parte de las especies de este microorganismo tienen

la capacidad de acidificar el pH de su entorno edafológico mediante la liberación de ácidos orgánicos.

La fuente de carbono principal para su desarrollo metabólico es la celulosa o lignocelulosa.

El contenido de nitrógeno en suelo es un factor limitante, siendo la dosis adecuada de 100 mg N/ kg de suelo, pudiendo sobrevivir en concentraciones menores. La forma en que mejor asimila el nitrógeno es en la orgánica, aunque también tolera la forma mineral como es la amoniacal, no tolerando la presencia de nitrógeno nítrico. El contenido en fósforo varía según la especie, estando en torno a 2 mg P/ kg de suelo. Este microorganismo tiene la capacidad de asimilar nitrógeno mineral en forma de fosfato, pero también puede mineralizarlo de formas orgánicas, facilitando su absorción por parte de la planta.

El contenido en micros nutrientes y oligoelementos son necesarios para el crecimiento de *Trichoderma* sp, se debe señalar que no necesita de aportes adicionales pues estos se encuentran suficientemente representados en el suelo.

En general, este microorganismo, es tolerante a la aplicación de pesticidas químicos, aunque su crecimiento se ve reducido por los metales pesados presentes en los mismos.

La presencia en el medio a inocular de una elevada actividad microbiana dificulta también el establecimiento y supervivencia de este microorganismo. (Norte, 2010)

### **1.2.3 Características**

El *Trichoderma* es un hongo que crece relativamente rápido, con un micelio aéreo ligeramente algodonoso, que desprende un ligero olor a coco. Tiene una acción antagonista directa contra muchos hongos patógenos que viven en el suelo (*Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Verticillium* spp. *Armillaria* spp. *Phyochaeta* spp.) y plantas (*Phytophthora* spp., *Botrytis* spp. etc ..). La cepa presente en este producto se distingue por su alta adaptabilidad al medio ambiente y especialmente por su elevada agresividad contra los agentes patógenos.

Las cepas de este hongo Trichoderma germinan y desarrollan un micelio óptimo para establecer la colonización necesaria que permite actuar frente a los patógenos que estén presentes en el suelo o que lleguen a aparecer, por lo que actúan como agentes de control biológico, reduciendo aquellos microorganismos indeseables en el suelo, mediante varios mecanismos de acción los cuales son :

- Depredación: el hongo Trichoderma ataca directamente al agente patógeno.
- Producción de metabolitos: estos son tóxicos para los hongos patógenos.
- Competencia: el Trichoderma crea con las raíces del árbol una asociación simbiótica, es decir, un beneficio mutuo a través del cual actúa como barrera física a la penetración de las hifas de los patógenos en las raíces. (Harman, 2006)

#### **1.2.4 Usos.**

Al aplicar este hongo a las semillas, medio de vivero, plantas en vivero, recién trasplantadas o plantas establecidas, este coloniza las raíces formando una capa protectora sobre ellas con la ventaja que el hongo crece con las raíces formando una especie de guante, protegiéndolas siempre. El hongo y las raíces forman una simbiosis. El hongo se alimenta y vive del exudado que producen las raíces pero al colonizarlas les confiere a estas una protección, la cual puede ser de tres maneras:

- El primer tipo de protección la logra al consumir ese exudado que liberan las raíces, el cual es el alimento inicial que usan los hongos patógenos para infectar la planta y muchos de estos lo usan para encontrar las raíces que ellos infectan.
- El segundo tipo de protección del Trichoderma sp. se debe a que es un hongo antagonista, por lo que cualquier hongo patógeno que atraviesa el “Guante” protector, es destruido, consumiéndolo y usándolo como alimento.
- El tercer tipo de protección es por exclusión. Esto es porque el Trichoderma sp, ocupa todos los espacios cercanos a las raíces dando una barrera física y

excluyendo de esa área a cualquier hongo patógeno que se encuentre en esos espacios. (Harman, 2006)

### **1.2.5 Modo de acción.**

Los hongos entomopatógenos actúan principalmente por contacto, cuando el hongo es capaz de penetrar el insecto es invadirlo, provocándole la muerte por micosis.

La mayoría de los autores (Elósegui, Hernández-Rodríguez y J. Ferré, 2006) abordan ampliamente el ciclo infectivo de estos hongos dividiéndolo en las siguientes etapas: una parasítica y otra saprofítica. La primera incluye la adhesión del conidio a la cutícula del insecto, la germinación (estimulada por los lípidos cuticulares del hospedante en calidad y proporción), penetración (complejos multienzimáticos con enzimas secretadas como lipasas, quitinasas y proteasas activadas secuencialmente) y multiplicación del hongo (por blastosporas fundamentalmente) con la consiguiente producción o no de toxinas, en dependencia de la cepa presente, que finaliza con la muerte del insecto. La segunda fase se caracteriza por una colonización total con melanización y momificación del individuo, emergencia del hongo y su esporulación, cuando la humedad relativa microambiental sea alta. Estos conidios pueden diseminarse mediante el viento, el agua, otros organismos y el hombre, para así iniciar un nuevo ciclo infectivo.

En el caso de los hongos antagonistas para el control de plagas (patógenos de plantas) se encuentran, dentro de los más empleados, especies del género *Trichoderma*. Este hongo tiene la capacidad de parasitar a otros hongos lo que se conoce como hiperparasitismo o micoparasitismo, hacia diferentes patógenos de plantas. Su modo de acción es complejo donde están incluidos el quimiotaxismo, la antibiosis y el parasitismo. La interacción inicial entre el parásito y el hospedero parece ser del tipo quimiotrófico. La hifa del micoparásito crece directamente hacia el hospedero en respuesta a las lectinas secretadas por este, las que se unen a los residuos de galactosa en la pared celular de *Trichoderma* siendo la señal que permite dirigir el crecimiento hacia esa zona. (Elósegui et al, 2006)

Este microorganismo secreta enzimas que actúan como un complejo con acción sinérgica sobre el patógeno debilitando la pared y permitiendo la difusión de los antibióticos hacia este. Después del contacto físico microscópicamente se observa la presencia de haustorios, enrollamiento de la hifa del biocontrol sobre la del patógeno, vacuolización, formación de gránulos, desintegración del citoplasma y lisis celular.

Este género actualmente se estudia a profundidad por la respuesta sistémica inducida al ataque de otros patógenos y por ser fuente de genes que codifican para proteínas (enzimas como glucanasas, proteasas)) y metabolitos (fitohormonas) con acción estimuladora y defensiva en la planta, los que se están usando en protocolos de transgénesis en especies de plantas de importancia económica con resultados muy alentadores. (Elósegui, 2006)

### **1.3 Bioplaguicida *Bacillus thuringiensis***

#### **1.3.1 Concepto de *Bacillus thuringiensis*:**

El (Bt) es una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta, morfológicamente relacionada con *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*. Estas tres especies bacterianas, durante su ciclo de vida, presentan dos fases principales, la fase de crecimiento vegetativo en donde las bacterias se duplican por bipartición cada 30-90 min dependiendo del medio de cultivo y la fase de esporulación, la cual es un programa de diferenciación de bacteria a espora. El programa de diferenciación consta de siete estadios, se dispara cuando la bacteria se encuentra en limitación de nutrientes. La espora es una forma de vida latente que puede permanecer en el ambiente por periodos de tiempo muy largos (años) en ausencia de humedad y nutrientes. Cuando la espora se encuentra de nuevo en un medio rico que contenga los nutrientes necesarios puede germinar para comenzar de nuevo el crecimiento vegetativo. (Aronson, 1986)

### **1.3.2 Propiedades**

*Bacillus thuringiensis* forma inclusiones cristalinas visibles al microscopio óptico durante la esporulación, las cuales están compuestas por protoxinas, que contienen dendotoxinas, de actividad insecticida específica contra insectos.

Algunas variedades de *Bacillus thuringiensis*, al igual que *Bacillus cereus*, pueden además producir otra toxina, la b-exotoxina, la cual se produce durante el crecimiento vegetativo, y es un derivado nucleotídico de la adenina que funciona como inhibidor de la RNA-polimerasa. Se debe señalar que la utilización de esta toxina está prohibida en algunos países, pues es tóxica también para mamíferos. (Carreras, 2003)

Casi todas las variedades de Bt son capaces de formar más de un tipo de cuerpos de inclusión. Cada variedad de este microorganismo puede tener un número variable de plásmidos responsables de la síntesis de diferentes d-endotoxinas. Debido a que estos portan varios genes de toxina (genes cry), a veces idénticos. Además, Bt puede tener diferentes transposones que contribuyen a aumentar la diversidad genética de estas toxinas.

Las diferentes variedades de Bt pueden intercambiar fácilmente sus plásmidos mediante un proceso semejante a la conjugación, fenómeno que ha sido demostrado en el intestino de larvas de mosquito. De este modo, las variedades de Bt pueden también intercambiar plásmidos que contienen genes de d-endotoxina (los genes cry), y así aumentar su espectro de acción contra más especies de insectos. (Carreras, 2003)

### **1.3.3 Características.**

Bt pertenece a la familia Bacillaceae, y presenta células vegetativas en forma de bastoncillos o menos largos, agrupados en cadenas de dos a tres células. Son Gram positiva, aerobias y esporógenas, durante su cultivo y asociadas a la formación de esporas, se forman cuerpos parasporales en forma de cristales que tienen efecto insecticida y se conocen como delta endotoxinas. Para la clasificación de esta especie se han usado varios métodos. Los primeros se basaron en la caracterización



morfológica y bioquímica, utilizando técnicas convencionales. Más tarde se desarrollaron esquemas de clasificación basados en el análisis serológico, de antígenos flagelares (antígeno H) de células vegetativas. Se introdujo además el criterio de patrones electroforéticos de esterases y de patrones plasmáticos dada la presencia de plásmidos como portadores de los genes que codifican para las toxinas cristaleras. La delta endotoxinas se producen en forma de cuerpos de inclusión o cristales paraesporales y forman una familia de proteínas cuyos miembros pueden ser tóxicos contra diversos grupos de invertebrados seis ordenes de insectos, nematodos, caros, platelmintos y protozoos. (Soberón ,1998).

#### **1.3.4 Usos.**

Las toxinas de Bt se han utilizado como bioinsecticidas en agricultura durante los últimos 40 años, principalmente en cultivos de hortalizas y cereales. Un caso excepcional es el control de mosquitos por una cepa de Bt conocida como *Bacillus thuringiensis subespecieisraeliensis* (Bti). Esta bacteria produce tres toxinas Cry (Cry4A, Cry4By Cry11A) y dos toxinas Cyt (Cyt1A y Cyt2A) con alta actividad insecticida contra larvas de diferentes especies de mosquitos y otros dípteros. Bti se ha ocupado por más de 30 años en el control de mosquitos y moscas transmisoras de enfermedades como el dengue, la malaria y la oncocercosis sin que a la fecha se haya reportado aparición de resistencia.(Ferre,2008)

#### **1.3.5 Modo de acción.**

Anteriormente estas toxinas deben ser ingeridas por el insecto sensible, cuyo intestino tiene un pH elevado, lo cual es esencial para la disolución de muchas protoxinas de Bt y estas son solubles solamente con pH superiores a 9,5.Las protoxinas son activadas por proteasas del intestino, las cuales llevan las primeras de 130 kDa a una toxina de 55-65 kDa, resistente a proteasa y que comprende la región N terminal de la protoxina.

La especificidad de la delta endotoxina a un tipo de insecto en particular implica la presencia de receptores específicos, la toxina se inserta de forma irreversible a la membrana plasmática de las células intestinales y el próximo paso es la formación de

un poro o lesión en esta membrana que conduce a una variación en su permeabilidad, alterando el transporte de los iones de potasio, lo cual trae como consecuencia la lisis celular, disrupción de la integridad del intestino y la muerte del insecto. Por otra parte, las esporas bacterianas se multiplican en la hemolinfa y provocan una septicemia que incrementa el efecto de las toxinas insecticidas.

En el caso de las Beta exotoxinas, estas interfieren con las síntesis de ADN y ARN y las proteínas y resultan menos específicas. (Pérez, 2005)

#### **1.4 Bioplaguicida *Beauveria bassiana*.**

##### **1.4.1 Concepto *Beauveria bassiana*.**

El beauveria es un hongo filamentoso que está considerado como un biocontrolador más utilizado en la actualidad para controlar las plagas de importancia económica como la broca del café. Sin embargo, las cepas de este hongo entomopatógeno exhiben una variación en su virulencia, lo cual limita su eficiencia y uso. (Vega, 2002)

##### **1.4.2 Propiedades.**

El agua de la solución debe estar a un pH de 6-7, con dureza inferior a 300 ppm. Para obtener una mayor calidad en la aplicación es recomendable el uso de BIO Stick adicionando 250 cc/hL para proveer humectación, adherencia y protección a la degradación por efecto de los rayos solares.

No deben realizar mezclas con benomilo, carbendazim, imazalil, procloraz, propiconazol, tebuconazol, tiabendazol, tiofanato metílico, triflumizol, ni productos de reacción alcalina para que no se alteren el rango de pH de la mezcla, además evitar el uso de coadyuvantes iónicos.

La viabilidad del producto se ve afectada si se expone directamente a los rayos solares. Se deben evitar temperaturas superiores a los 30° C durante tiempos prolongados. Durante periodos largos conservarlo bajo refrigeración a 3 - 4° C sin llegar a congelarlo

para mantener su viabilidad. Se debe señalar que se debe aplicar la solución el mismo día de su preparación. (Vega, 2002)

### **1.4.3 Características.**

*Beauveria bassiana* es un hongo entomopatógeno caracterizado por controlar plagas a nivel mundial por sus excelentes características patogénicas. La eficacia de este hongo en el control depende de variables como aislamientos específicos, humedad y temperaturas adecuadas necesarias para la germinación y esporulación en el insecto

*Beauveria bassiana* es un hongo entomopatógeno que tolera un rango amplio de temperatura y humedad relativa, es así como se explica la capacidad de esta especie para adaptarse a diferentes áreas edafoclimáticas. (Fabian, 2002)

### **1.4.4 Usos.**

Este microorganismo actúa por contacto y causa la muscardina blanca. Controla mosquita blanca (*Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum*), mosca pinta (*Aeneolamia postica*, *Prosapia simulans*), broca del café (*Hypothenemus hampei*), gallina ciega (*Phyllophaga* sp.), picudo negro del plátano (*Cosmopolites sordidus*), picudo del cocotero (*Rhyncophorus palmarum*) y larvas de lepidópteros (barrenadores, minadores, taladradores, cortadores, enrolladores de las hojas, medidores. (Agroquímicos de México, 2009)

### **1.4.5 Modo de acción.**

Los hongos entomopatógenos, infectan al hospedante a través de la cutícula externa. Esta forma de penetración es única de los hongos ya que otros entomopatógenos como bacterias y virus penetran por vía oral. El contacto entre el inóculo del entomopatógeno y el insecto es fundamental para el inicio del proceso infeccioso; el contacto ocurre al azar, un clima favorable, suficiente cantidad de inóculo en el ambiente, así como la existencia de suficientes insectos hospedantes son factores que favorecen el efecto de los hongos entomopatógenos. La epicutícula o capa externa del integumento del hospedante es el sitio inicial de la interacción patógeno-hospedante. El

integumento es una estructura muy compleja, cuya composición química es muy importante para el proceso de penetración. Entre sus componentes se encuentran lípidos, lipoproteínas, polifenoles y proteínas. Se ha observado que esta capa posee finos canales por los cuales ocurre el suministro de ceras, azúcares y proteínas, los cuales juegan un rol muy importante de las interacciones señal-receptor, entre la cutícula y la espora. Azúcares no estructurales y compuestos nitrogenados producidos por plantas o el insecto puede contaminar la cutícula, afectando así el proceso de fijación. (Monzón, 2001)

### **1.5 Materias primas y auxiliares para la producción de bioplaguicidas.**

Las materias primas más usadas en la producción de bioplaguicidas son las siguientes:

- Almidón del maíz (maicena)
- Levaduras torula
- Papas
- Arroz
- Estrato de caña
- Aceite de soya o Girasol como antiespumantes
- $\text{CaCO}_3$
- $\text{MgSO}_4$
- $\text{Fe SO}_4$
- Agua de líquido transparente
- Fósforo
- Nitrógeno
- Azúcares reductores

Los materiales auxiliares usados en las diferentes etapas se muestran en la Tabla 1.1.

**Tabla 1.1 Relación de materiales auxiliares en las diferentes etapas.**

<b>Materiales auxiliares</b>	<b>Etapas</b>
NaOH, HCl, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Limpieza, para ajustar pH
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , Formaldehído	Desinfectar
CaCO <sub>3</sub> , MgSO <sub>4</sub> , FeSO <sub>4</sub> , Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	Reactivos químicos

### **1.6 Proceso de producción:**

En biotecnología son utilizados dos tipos de producciones básicas: cultivos superficiales sobre medios sólidos o semisólidos y producción en medios líquidos o sumergidos.

Uno de los aspectos más importantes de *Trichoderma*, *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana* en la producción a escala industrial. La primera etapa, la cual es una de las más importantes de este proceso, es la selección y conservación de las cepas de trabajo. En muchos países se desarrollan programas de prospección de nuevos aislamientos de la bacteria para ampliar su espectro y aumentar su capacidad insecticida. El mantenimiento y conservación de las cepas seleccionadas es una garantía del éxito del proceso y del producto final. Para la conservación se emplea diferentes métodos, entre los más utilizados están la liofilización, suelo estéril, papel de filtro, medio agarizado, etc. Lo más importante es evitar los subcultivos continuos, porque se puede perder la virulencia y podrían aparecer poblaciones acristalíferas. El desarrollo del producto a partir de la cepa seleccionada comienza con la preparación de los inóculos, los cuales se obtienen generalmente en zaranda mediante cultivos líquidos agitados y a partir de estos se realizan uno o dos subcultivos en fermentadores de menor volumen, dependiendo de la magnitud del volumen final de trabajo. Se recomienda que los inóculos tengan una concentración inicial de  $10^6$  (células /mL).

Pueden utilizarse cultivos totalmente esporuladores o en fase de crecimiento exponencial, pero no es recomendable utilizar otros instares porque los cultivos obtenidos no serían homogéneos.

La composición del medio de cultivo es muy importante porque es necesario ajustar el balance de los nutrientes, principalmente carbono y nitrógeno para obtener una concentración elevada de biomasa bacteriana y una buena cantidad de cristales tóxicos. Otros nutrimentos también son importantes, tales como sales de magnesio, manganeso, carbonatos y fosfatos.

Como fuentes nitrogenadas se utilizan harinas de soya, maíz, trigo y pescado entre otras y como fuentes de carbono se emplean principalmente almidones y en ocasiones melazas. El valor de pH es un parámetro importante y aunque generalmente se deja libre durante el proceso, es necesario ajustar los medios de cultivo para que no sea menor de 5,0. En general, el pH inicial debe ser de 6,8-7,2, pero baja después en las primeras 8-12h, 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.

Durante el proceso de producción de estos microorganismos es importante considerar el suministro de oxígeno porque ellos requieren 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 que 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 de proceso. También puede ocasionar problemas durante el recobrado y la formulación.

Los procesos industriales se realizan en grandes fermentadores y el recobrado mediante procesos de sedimentación, filtración o centrifugación, este último es el más eficiente. (Larrea, 2000)

Husz en 1931 utiliza un medio sólido y métodos estándares de laboratorio mezclando esporas de estos microorganismos de 224 cajas de petri con 6 kg de talco para la producción de polvos. Steinhaus y Hall en 1951 y 1954 produjeron estos mismos en caja con agar. Actualmente, se desarrollan los métodos de producción por cultivo sumergido, los cuales son más eficientes, económicos, permiten la producción a mayor escala, con menos contaminación y mejor control de calidad.

En China, la producción por cultivo sumergido se realiza en forma industrial y sobre sustratos sólidos a pequeña escalas, en forma artesanal. También utilizan bandejas o frascos con medios líquidos en condiciones de cultivo estático estos microorganismos son producidos en formas sólidas, semisólidas y por cultivo sumergido o líquido estático; sin embargo, la producción escala comercial se realiza por fermentación sumergido en grandes tanques que contienen medio de cultivo.

En los medios semisólidos, la humedad debe controlarse muy bien para asegurar el desarrollo de los microorganismos sin provocar agregación de las partículas y con una adecuada transferencia de oxígeno. La producción semisólido de esta bacteria en China permite obtener cantidades importantes de microorganismo, pero con menor eficiencia que por cultivo sumergido y sólo a escala limitadas de producción.

Otro de los aspectos negativos es la esterilidad durante el proceso de producción. Mantener condiciones uniformes durante el proceso y ajustar parámetros como el pH y la temperatura resultan difíciles en los medios sólidos y semisólidos. Por tanto, se considera que el mejor método de producción es el sumergido. (Larrea, 2000)

A partir de los estudios realizados por el autor sobre la producción de bioplaguicidas se puede decir que lo más importante en el mismo es la selección y conservación de las cepas de trabajo ya que es una garantía del proceso y del producto final.

A continuación se detalle las etapas del proceso de producción de estos bioplaguicidas, en el Anexo 2 se muestra el diagrama del mismo:

- Etapa 1: Elaboración del medio de cultivo

Se elabora el medio de cultivo con las materias primas: almidón de maíz (maicena), levadura de torula, papas, arroz extracto de caña, aceite de soya o girasol como antiespumante algunas sales ( $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{Fe SO}_4$ ) se ajusta el pH =8 antes de esterilizar. Se disuelven estas materias primas en agua destilada estéril y se esteriliza bajo condiciones específicas de esterilización. Se disuelven la cepa dentro del flujo laminar (cabina de trabajo con condiciones para evitar contaminación del medio ambiente). La cual servirá para sembrar o inocular cada erlenmeyer con medio de cultivo estéril.

- Etapa 2: Etapa de fermentación

Este pre-inóculo pasa la zaranda para permitir el crecimiento de la bacteria (microorganismo desarrollar) durante 18 a 24 horas, al final se revisan para verificar calidad de pre-inoculo.

Después de zarandear se lleva a la sala de fermentación, donde se prepara medio de cultivo a escala industrial con las mismas materias primas. Estas se disuelven dentro el fermentador con agua suavizada y se ajusta pH = 8 antes de esterilizar generalmente con NaOH. Se procede a esterilizar hasta  $121^{\circ}\text{C}$  durante una hora con vapor de la caldera. Posteriormente se enfría con agua a  $12^{\circ}\text{C}$  (viene de cisterna de agua fría) hasta lograr una temperatura entre  $28\text{-}30^{\circ}\text{C}$  en el medio de cultivo. Se circula aire al medio para oxigenarlo.

- Etapa 3: Etapa de inoculación o siembra:

Se hace destapando el fermentador bajo el flameo para evitar contaminaciones ambientales y consiste el pre-inoculo proveniente de la zaranda dentro de fermentador, seguidamente se procede a fermentar durante 24-48 horas. (es necesario que medio de cultivo del fermentador ante de inocular se muestra verificado que la esterilización



fue correcto, después de inocular también se muestra para comprobar que la manipulación al inocular fue buena). (Orestes, 2002)

### **1.7 Control de calidad en procesos.**

La calidad y el control de procesos están completamente imbricados en los procesos de producción químicos, biológicos, del gas y petróleo, vidrio y cemento, alimentación y bebidas, pasta y papel, tratamiento de aguas, acondicionamiento de aire, textiles, siderometalúrgicos, farmacéuticos, tenería, mineros, de generación de energía etc.(González, 2009)

El "Control de Procesos" enseña los métodos, herramientas, aparatos y tecnologías para medir estas variables en distintos puntos del proceso de fabricación, teniendo en cuenta sus condicionantes específicos como la naturaleza del producto, su estado, grado de peligrosidad, limitaciones (de espacio, distancia, accesibilidad, explosividad, radiactividad ...), límites de error aceptables para medir cada variable en cada punto del proceso, visualización de la medida, precios relativos entre varias posibles soluciones, pros y contras de cada una de ellas, etc., etc.( González ,2009)

### **1.8 Conclusiones Parciales.**

Al consultar la bibliografía se pudo llegar a las conclusiones siguientes:

- Las etapas principales del proceso de producción son: elaboración del medio de cultivo, la fermentación y siembra del cultivo.
- Los principales bioplaguicidas que se producen en Cuba son: *Beauveria bassiana*, *Trichoderma*, *Bacillus Thuringiensis*.
- Las principales variables de operación del proceso de obtención de biopreparados son; la temperatura, velocidad de agitación y presión en los fermentadores.
- Los principales parámetros de calidad de los microorganismos son: la concentración, la viabilidad, la pureza y la virulencia.

## *Capítulo 2. Materiales y Métodos.*

En este capítulo se muestran las variables analizadas estadísticamente, las técnicas analíticas aplicadas para su determinación y las herramientas estadísticas usadas.

### **2.1. Variables analizadas.**

#### **2.1.1. En el proceso.**

Se estudian las variables operacionales temperatura (°C) y velocidad de agitación (rpm) en los cinco fermentadores de la planta, los cuales se diferencian según el tipo de microorganismo a obtener. A continuación se detalla la relación entre fermentador y microorganismo en el período de estudio:

Fermentador 1: Bacillus Thuringiensis (Bt)

Fermentador 2: Bacillus Thuringiensis (Bt)

Fermentador 3: Trichoderma (TS3)

Fermentador 4: Trichoderma (TS3)

Fermentador 5: Bacillus Thuringiensis (Bt)

Los datos corresponden al período 2007 – 2009. (Ver Anexo 3)

Los rangos óptimos de la temperatura y la velocidad de agitación en los fermentadores varían según el tipo de microorganismo a producir, en la Tabla 3.1 se muestra esta relación:

**Tabla 2.1. Relación microorganismo – fermentador – temperatura - velocidad de agitación.**

<b>Microorganismo</b>	<b>Fermentadores donde se producen</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Velocidad de Agitación (rpm)</b>
Bt	1, 2, 5	25 – 32	90 – 95
TS3	3,4	24 – 32	90 – 92

No se analiza la presión en los fermentadores porque se mantiene constante (0.05  $\mu$ Pa) durante todo el proceso, para cualquier microorganismo.

### **2.1.2 En los productos finales.**

En el proceso se producen tres tipos de microorganismos: Bacillus Thuringiensis, Trichoderma y Beauveria Bassiana (Bb), este último solo se ha producido 4 veces, por lo que no se analiza en este trabajo.

Las variables de estos productos finales que permiten definir si cumplen con las especificaciones de calidad son las siguientes: viabilidad (%), concentración (conidios/mL), pureza (%) y virulencia (%), estas dos últimas no se analizan en este trabajo pues en el período de estudio no se encuentran resultados que arrojen contaminación en las muestras, es decir, la pureza en todos los casos es de 100 % y para la virulencia se necesita de un insecto patógeno que no se cuenta con él, por lo que este análisis no se realiza. Los datos fueron recopilados durante el período 2007 – 2009. (Ver Anexo 7).

La concentración debe ser igual o superior a  $10^8$  conidios/mL y la viabilidad igual o mayor que 90 %, estas especificaciones son para cualquier tipo de microorganismo.

## **2.2 Técnicas usadas para determinar las variables que definen la calidad de producto final.**

### **2.2.1 Determinación de la Viabilidad (%)**

Se realiza como un indicador de la capacidad y velocidad para emitir un tubo germinativo "in vivo" y poder penetrar potencialmente la cutícula del insecto blanco.

Para realizar esta prueba se toma un portaobjetos estéril al que se le coloca en cada extremo una gota de medio de cultivo agarizado con una pipeta. Rápidamente se voltea de un extremo a otro para extender uniformemente el medio sobre dicho portaobjetos. Se le añade 0.01 mL de una suspensión de conidios a una concentración de  $10^7$  conidios/mL, aproximadamente. Este portaobjetos se incuba en cámara húmeda estéril por 18-24 hrs, observándose al microscopio óptico y se cuentan 100 conidios por campo, determinándose el número de ellos que ha germinado en este tiempo. (Orestes, 2002)

- Materiales usados:

- Portaobjetos
- Placas Petri
- Papel de filtro
- Tubos con medio de cultivo agarizado
- Pipetas.

### **2.2.2 Determinación de la concentración (conidios/mL)**

Esta técnica cuantitativa determina la cantidad de conidios del hongo entomopatogénico presente en una muestra. No evalúa la calidad biológica de estas estructuras. Los conteos de conidios se realizan en cámara de Neubauer utilizando el microscopio óptico con el objetivo de 40X. Se realizan diluciones decimales con Tween-80 al 0.1 % a partir del biopreparado o cepa (en el caso de producciones sólidas se pesa 1g del producto en 10mL de agua destilada) y el conteo se realiza

con la dilución en que aparezcan entre 50 y 300 conidios en la cámara.

Se coloca el cubreobjetos de cuarzo sobre el hemocitómetro; con un capilar transferir un volumen suficiente a la cámara, colocando la punta del capilar entre el cubreobjetos y la cámara descargando por capilaridad, hasta que se llene con el volumen exacto sin que queden burbujas en su interior. Después de cargada se deja reposar durante un minuto y se cuenta en cinco cuadrantes (los cuatro de los vértices de la cámara y un cuadrante central). El resultado se da de la siguiente forma: (Orestes, 2002)

$$C = K \cdot N \cdot D$$

C-cantidad de conidios/mL.

K- constante de la cámara de Neubauer ( $5 \cdot 10^4$ )

N- cantidad de conidios contados en cuadrantes.

D- dilución.(%)

- Materiales usados:

- Biopreparado de los microorganismos.
- Agua estéril con Twen 80 al 0,1%
- Asa de siembra o escalpelo.
- Cámara de Neubauer.
- Tubos capilares.
- Microscopio óptico.

### **2.2.3 Determinación de la pureza.**

El biopreparado deberá estar libre de todo tipo de contaminaciones. Para su control se realizará:

1. Observación directa de muestras al microscopio óptico.

2. Tincin diferencial Gram.
3. Siembra en placas con medios agarizado donde se deben observar a partir de las 24 horas para chequear posible contaminaciones bacterianas, en caso de que el producto estuviese contaminado a través de una tincin de Gram si se detectan contaminaciones en la corrida debe esterilizarse y eliminar.

Nota: Siempre se deberán dejar algunas placas con cultivos monospóricos (siembra del biopreparado a una concentración muy baja) para evaluar una posible contaminación por otro hongo, lo que generalmente toma más de 72 horas. (Orestes, 2002)

- Material usado:

- Microscópico

#### **2.2.4 Determinación de la virulencia (%)**

Debido a la diversidad y variabilidad en el espectro de acción de los diferentes microorganismos que se utilizan para estos fines e incluso la especificidad de algunos sobre determinadas especies, se plantea la necesidad de tener insectos patrones para cada tipo de microorganismo e incluso para diferentes cepas. Para la realización de esta prueba se usan al menos 50 insectos, 10 de ellos para cada réplica (4) y los otros 10 restantes como testigo.

A los insectos, de las cuatro réplicas se les somete a la acción del biopreparado por inmersión o aspersión, luego se pasan a frascos con dieta estéril. A partir de los tres-cuarto días se colectan diariamente los cadáveres, se desinfectan con hipoclorito de sodio al 0.10% por dos o tres minutos y se colocan en cámara húmeda hasta que en la superficie del cadáver aparezca el crecimiento del hongo en cuestión. Finalmente se cuentan los insectos micosados y se determina el porcentaje de mortalidad. (Orestes, 2002)

### 2.3 Herramientas estadísticas.

Para aplicar las herramientas estadísticas se utiliza el paquete estadístico STATGRAPHICS. Las técnicas estadísticas usadas en este trabajo para el análisis de los parámetros de calidad de la concentración y la viabilidad son las siguientes:

- Caracterización estadística.

Los parámetros que caracterizan estadísticamente una muestra son:

$$\text{Media: } \bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{N} \quad \text{Varianza: } S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{N-1}$$

$$\text{Desviación estándar: } S = \sqrt{S^2} \quad \text{Coeficiente de variación: } CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

La distribución de frecuencias permite agrupar los datos por clases y determinar en que intervalo se encuentran la mayor cantidad de valores. Además, a partir de la tabla de distribución se construyen los histogramas de frecuencias, que definen si las muestra presentan una distribución normal. (LOWRY, 2004)

- Pruebas de normalidad:

La NC 92-21 establece las reglas para determinar los resultados anormales de un conjunto de observaciones de una variable aleatoria continua, cuya distribución probabilística sea normal.

Resultado anormal: Dato grandemente desviado del grupo de resultados normales de las observaciones y que no pertenece a la distribución probabilística de esos resultados. En la determinación de los resultados anormales hay que analizar dos alternativas:

1. El resultado muy desviado fue obtenido bajo las mismas condiciones que el grupo restante de los resultados de las observaciones, perteneciendo a la misma población, pero la probabilidad de obtener resultados iguales o mayores (o menores) al mismo es

pequeña. En este caso, el resultado a evaluar no hay que excluirlo y el cálculo de los estadígrafos seleccionados para estimar los parámetros de la población (media y desviación típica) debe efectuarse teniéndolo en cuenta.

2. El resultado muy desviado se obtuvo a consecuencia de la alteración de las condiciones normales de la investigación o de errores graves en la medición o en el cálculo. En este caso, el resultado que se evalúa del conjunto de observaciones no pertenece a la población de los resultados normales y por consiguiente el cálculo de los estadígrafos seleccionados para estimar los parámetros de la población debe efectuarse con el conjunto de datos, excluyendo el resultado anormal de la observación.

- Pruebas de hipótesis.

A partir de las pruebas de hipótesis se puede inferir si una variable cumple con las especificaciones de calidad, planteando dos hipótesis (nula y alternativa).(EILON,1969)

- Análisis de varianza.

El análisis de varianza permite inferir si existen diferencias significativas entre más de dos muestras, es decir, si uno o más factores influyen significativamente sobre una variable. (WEST et al, 2004)

- Gráficos o cartas de control:

Las cartas de control o gráficos de control se definen como “una comparación gráfica – cronológica de una característica actual de la calidad del producto, con los límites que identifican su manufactura, de acuerdo a experiencias anteriores”. Analizando en detalle esta definición:

Se trata de un gráfico, donde uno de sus ejes incluye la variable tiempo (gráfico cronológico), el otro eje se incluirá la variable que determina la calidad del producto (característica de la calidad del producto). El gráfico debe poseer límites o fronteras que indican si el producto posee o no calidad, según la zona es que se ubique la



variable (con los límites que identifican la posibilidad de su manufactura). Finalmente, el gráfico se construye con datos históricos de la variable y determina la calidad del producto (experiencias anteriores). (GOLDERG et al, 2003)

#### **2.4 Conclusiones parciales del capítulo**

- Para la determinación de los parámetros de calidad de la concentración y viabilidad se aplican métodos químicos y biológicos.
- Las herramientas estadísticas usadas son: caracterización estadística, distribución de frecuencias, prueba de normalidad, pruebas de hipótesis, análisis de varianza y cartas de control.

## *Capítulo 3. Resultados y discusión.*

En este capítulo se muestran todos los resultados obtenidos al realizar las diferentes pruebas estadísticas que permiten definir si las variables operacionales (temperatura y velocidad de agitación) y los parámetros de calidad del producto final (concentración y viabilidad) cumplen con las especificaciones requeridas.

Las pruebas realizadas son: caracterización estadística, determinación de anormalidad en una muestra, histogramas de distribución de frecuencias, pruebas de hipótesis, análisis de varianza y cartas de control.

### **3.1. Análisis estadístico para las variables operacionales.**

Los datos recopilados de estas variables se muestran en el Anexo 3.

Para realizar un análisis de las variables operacionales (temperatura y velocidad de agitación) se separan los datos por fermentadores. La relación fermentador-microorganismo es la siguiente.

Microorganismo Bt: Datos de los fermentadores 1, 2 y 5.

Microorganismo TS3: Datos de los fermentadores 3 y 4.

#### **3.1.1 Caracterización estadística de la temperatura y la velocidad de agitación.**

En la Tabla 3.1 se muestra la caracterización estadística de estas variables operacionales para los fermentadores.

Los valores medios de la temperatura en los fermentadores se encuentran entre 26.22 y 30.03 °C, los cuales están comprendidos en los rangos de las especificaciones de operación. Los coeficientes de variación son menores que 12 % en todos los casos,

indicando que los valores están agrupados alrededor de la media, es decir, esta es representativa, los que tienen más dispersión son los fermentadores 4 (10.67 %) y 5 (9.24 %), en el caso del 4 hay momentos en que falta el fluido eléctrico y la temperatura disminuye, alcanzando valores hasta 16 °C.

**Tabla 3.1 Resumen de la caracterización estadística de las variables operacionales.**

	Temperatura					Velocidad de agitación				
	F1	F2	F3	F4	F5	F1	F2	F3	F4	F5
n	175	50	255	385	265	145	50	255	155	265
$\bar{X}$	29.76	29.12	30.03	26.22	28.58	88.16	80.47	89.04	84.56	89.69
S <sup>2</sup>	1.63	1.13	0.45	7.83	6.98	47.28	49.61	19.89	63.98	34.44
S	1.27	1.06	0.67	2.80	2.64	6.87	7.04	4.46	7.99	5.87
Mín	23.5	25.8	26.9	16	24.3	70.0	70.0	80.05	52	73.47
Máx	32	30.5	31.8	32	36.1	94.00	94.55	100.0	98	104.35
.										
C.S	-10.11	-5.18	-8.41	-2.54	-1.60	-7.42	-2.03	1.76	-9.50	-5.68
C.K	15.56	5.71	16.63	3.81	3.66	3.04	-2.25	0.72	12.93	3.81
C.V (%)	4.29	3.66	2.23	10.67	9.24	7.80	7.87	5.01	9.46	6.54

Los coeficientes de kurtosis y skewness permiten definir si una muestra tiene un comportamiento normal, si estos se encuentran entre -2 y +2 se plantea que la muestra presenta una curva gaussiana. La temperatura en ninguno de los fermentadores tiene estos coeficientes dentro del rango, por lo que se puede decir por el momento que la muestra no tienen un comportamiento normal, siendo necesario aplicar la NC 92-21 para excluir los datos anormales dentro de las muestras.

Al analizar la velocidad de agitación en los fermentadores se observa que las medias no superan el valor mínimo requerido (90 rpm), se debe señalar que los coeficientes de variación son menores que 12 %, es decir, los valores medios representan a los datos. En los histogramas de frecuencias en (Ver Anexo 4) se observa que la mayoría de los

valores se encuentran por debajo de 90 rpm, por lo que se debe demostrar a través de pruebas de hipótesis si esta variable cumple con estas especificaciones en todos los fermentadores. Solo la velocidad en el fermentador 3 presenta coeficientes de kurtosis y skewness dentro del rango que define una distribución normal, por lo que se identificaron los datos anormales a través de la NC 92-21. (CEN, 1979)

### 3.1.2 Prueba de normalidad para las variables operacionales.

Como se explica en el capítulo anterior cuando se aplican herramientas estadísticas en un proceso es necesario realizar la prueba de normalidad a las muestras a analizar, pues es este un requisito indispensable.

Para conocer si las variables presentan datos anormales, se utiliza la NC 92-21 (CEN (1979)). Para ello, se debe calcular  $t_i$ , donde  $i$  va a ser la enumeración del dato, es decir,  $t_1, t_2, \dots, t_n$ , por la siguiente expresión:

$$t_i = \frac{\left( x_i - \bar{x} \right)}{S}$$

Donde:  $\bar{x}$  es la media de la muestra

$x_i$  es el valor al que se le realiza la prueba

$S$  es la desviación estándar de la muestra.

A continuación se relacionan estos parámetros para cada variable de operación en los distintos fermentadores.

- Valores de  $h$  para la temperatura

$$T1: n = 175 \quad \bar{x} = 29.76^{\circ}C \quad S = 1.27^{\circ}C \quad h = 3.41$$

$$T2: n = 50 \quad \bar{x} = 89.15^{\circ}C \quad S = 1.06^{\circ}C \quad h = 3.082$$

$$T3: n = 255 \quad \bar{x} = 30.03^{\circ}C \quad S = 0.67^{\circ}C \quad h = 3.534$$

$$T4: n = 385 \quad \bar{x} = 26.22^{\circ}C \quad S = 2.80^{\circ}C \quad h = 3.625$$

$$T5: n = 265 \quad \bar{x} = 28.58^{\circ}C \quad S = 2.64^{\circ}C \quad h = 3.537$$

- Valores de h para la velocidad de agitación.

$$V1: n = 145 \quad \bar{x} = 88.16rpm \quad S = 6.87rpm \quad h = 3.41$$

$$V2: n = 50 \quad \bar{x} = 80.47rpm \quad S = 7.04rpm \quad h = 3.082$$

$$V3: n = 255 \quad \bar{x} = 89.04rpm \quad S = 4.46rpm \quad h = 3.534$$

$$V4: n = 155 \quad \bar{x} = 84.56rpm \quad S = 7.99rpm \quad h = 3.376$$

$$V5: n = 265 \quad \bar{x} = 3.537rpm \quad S = 5.87rpm \quad h = 3.537$$

En el Anexo 3 se muestran los resultados al aplicar esta norma a los datos de las variables operacionales, en dependencia del fermentador. Como se puede observar en ninguna de las muestras existen valores anormales, por lo que se puede definir que las mismas presentan una distribución normal.

### **3.2 Análisis del cumplimiento de las especificaciones de calidad en las variables operacionales.**

Para determinar si las variables temperatura y velocidad de agitación en los fermentadores cumplen con las especificaciones de operación se realizan pruebas de

hipótesis. Se debe señalar que se realizaron dos pruebas para cada una, debido a que la norma es un rango.

El tipo de prueba de hipótesis aplicada es la de t-student, donde se pueden tener en cuenta dos criterios de selección de la hipótesis verdadera, los cuales son:

1. Según el estadígrafo t-student:

El  $t_{\text{tabulado}}$  es la referencia para decidir que hipótesis se cumple. Si el  $t_{\text{calculado}}$  se encuentra en la región a la izquierda del  $t_{\text{tabulado}}$  se acepta la hipótesis donde  $\mu < \mu_0$  ó  $\mu \leq \mu_0$ , en dependencia de la norma y viceversa.

El  $t_{\text{calculado}}$  depende de las características de la muestra (media, desviación estándar y tamaño de la muestra).

El  $t_{\text{tabulado}}$  depende de los grados de libertad (tamaño de la muestra - 1) y del nivel de confianza  $(1-\alpha)$ . (Eillon, 1969)

2. Según el valor de probabilidad (p-value):

Si el valor de probabilidad es mayor que  $\alpha$  se acepta la  $H_0$  y se rechaza  $H_1$  y viceversa. El valor de  $\alpha$  es 100 -nivel de confianza. Todas las pruebas en este trabajo se realizan para un 95 % de confianza ( $\alpha=0.05$ ).

En la Tabla 3.2 se muestran los resultados de las pruebas de hipótesis para la temperatura en los fermentadores.

Como se puede observar la temperatura cumple con las especificaciones de operación requeridas, es decir, en el proceso se logra que en los fermentadores se alcance el rango de temperatura óptimo para el crecimiento de *Bt* y *ST3*. Esto se comprueba pues en todas las pruebas de hipótesis se aceptan las hipótesis nulas que son las que incluyen la norma para un 95 % de confianza, pues los valores de p-value son mayores que 0.05. Además, el  $t_{\text{Calculado}}$ , siempre se encuentra en la zona de aceptación de la norma.

**Tabla 3.2 Resultados de las pruebas de hipótesis para la temperatura.**

<b>Variable operacional</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>t<sub>calculado</sub></b>	<b>t<sub>tabulado</sub></b>	<b>p-value</b>
T1	$H_0: \mu \geq 25$ $H_1: \mu < 25$	49.34	1.645	1.00
	$H_0: \mu \leq 32$ $H_1: \mu > 32$	-23.24	1.645	1.00
T2	$H_0: \mu \geq 25$ $H_1: \mu < 25$	27.31	1.677	1.00
	$H_0: \mu \leq 32$ $H_1: \mu > 32$	-19.14	1.677	1.00
T3	$H_0: \mu \geq 24$ $H_1: \mu < 24$	143.50	1.645	1.00
	$H_0: \mu \leq 32$ $H_1: \mu > 32$	-46.86	1.645	1.00
T4	$H_0: \mu \geq 24$ $H_1: \mu < 24$	15.56	1.645	1.00
	$H_0: \mu \leq 32$ $H_1: \mu > 32$	-40.53	1.645	1.00
T5	$H_0: \mu \geq 25$ $H_1: \mu < 25$	22.08	1.645	1.00
	$H_0: \mu \leq 32$ $H_1: \mu > 32$	-21.05	1.645	1.00

En la Tabla 3.3 se muestran los resultados de las pruebas de hipótesis para la velocidad de agitación en los fermentadores.

En el caso de la velocidad de agitación se determina que en los fermentadores 1, 3 y 4 no se logra superar los límites inferiores de los intervalos de la norma (90 rpm), pues en las primeras pruebas de hipótesis para esta variable se acepta las hipótesis alternativas

( $\alpha < 0.05$ ) para un 95 % de confianza. Esto se debe a que el medio en que se produce el desarrollo de estos microorganismos tiende a hacer espuma, por lo que se disminuye la velocidad de agitación y también la entrada de oxígeno para evitar la contaminación del producto, se debe señalar que en el proceso se utiliza un antiespumante.

**Tabla 3.3 Resultados de las pruebas de hipótesis para la velocidad de agitación.**

<b>Variable operacional</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>t<sub>calculado</sub></b>	<b>t<sub>tabulado</sub></b>	<b>p-value</b>
V1	H <sub>0</sub> : $\mu \geq 90$ H <sub>1</sub> : $\mu < 90$	-3.22	1.645	0.0008
	H <sub>0</sub> : $\mu \leq 95$ H <sub>1</sub> : $\mu > 95$	-11.97	1.645	1.00
V2	H <sub>0</sub> : $\mu \geq 90$ H <sub>1</sub> : $\mu < 90$	-0.53	1.677	0.30
	H <sub>0</sub> : $\mu \leq 95$ H <sub>1</sub> : $\mu > 95$	-5.55	1.677	0.99
V3	H <sub>0</sub> : $\mu \geq 90$ H <sub>1</sub> : $\mu < 90$	-3.43	1.645	0.0003
	H <sub>0</sub> : $\mu \leq 92$ H <sub>1</sub> : $\mu > 92$	-10.59	1.645	1.00
V4	H <sub>0</sub> : $\mu \geq 90$ H <sub>1</sub> : $\mu < 90$	-8.46	1.645	0.00
	H <sub>0</sub> : $\mu \leq 92$ H <sub>1</sub> : $\mu > 92$	-11.58	1.645	1.00
V5	H <sub>0</sub> : $\mu \geq 90$ H <sub>1</sub> : $\mu < 90$	-0.86	1.645	0.19
	H <sub>0</sub> : $\mu \leq 95$ H <sub>1</sub> : $\mu > 95$	-14.73	1.645	1.00



### 3.3 Comparación de las variables operacionales en los diferentes fermentadores.

Para determinar si existen diferencias significativas de las variables operacionales con respecto a los fermentadores se realiza un Análisis de Varianza Unifactorial.

Al realizar un análisis de varianza existen dos criterios para definir si la influencia de factores es significativa en una variable dependiente:

1<sup>er</sup> Criterio: Si la  $F_{\text{calculada}} < F_{\text{tabulada}}$  existen diferencias significativas en la variable dependiente para los niveles de los factores, y viceversa

$F_{\text{tabulada}}$  depende de la probabilidad  $(1-\alpha/2)$ ,  $GL_{\text{entre grupo}}$ ,  $GL_{\text{dentro de grupo}}$

2<sup>do</sup> Criterio: Si el valor del p-value es menor que  $\alpha$  los factores influyen sobre la variable dependiente, y viceversa.

En el Anexo 5 se muestran los resultados de esta prueba y en la Tabla 3.4 se refleja un resumen de los mismos.

**Tabla 3.4 Resumen de los resultados del Análisis de varianza para la variables operacionales.**

Variable operacional	p-value	F-Fisher calculado	F-Fisher tabulado	Existencia de diferencias significativas	Fermentadores homogéneos
Temperatura (°C)	0.0000	152.52	2.80	Sí	1-3
Velocidad de agitación (rpm)	0.0009	4.70	2.80	Sí	1-2-3

Para las dos variables existen diferencias significativas entre los fermentados, para un 95 % de confianza, teniendo en cuenta los criterios explicados anteriormente. Para

identificar cuáles son los fermentadores que son diferentes entre sí se analiza la prueba de múltiple rango aplicando el método de Duncan. (Ver Anexo 5)

- Temperatura:

Solo entre los fermentadores 1 y 3 no existen diferencias significativas, lo cual se debe tener en cuenta en el proceso, pues los rangos de temperatura requeridos para el crecimiento óptimo de los microorganismos Bt y TS3 no varían, por lo que los fermentadores no deben operar a diferentes condiciones de temperatura. Se debe señalar que estos equipos no trabajan a volúmenes constantes, pudiendo ser esta una de las causas de este problema, el cual puede influir en la eficiencia del proceso, debido a que un mismo microorganismo se obtiene en diferentes fermentadores. (Anexo 5.1)

- Velocidad de agitación.

Como se observa solo son homogéneos con respecto a la velocidad de agitación los fermentadores 1, 2 y 3, los cuales operan a capacidades menores (120 -140 L). Sin embargo, los fermentadores 4 y 5 no tienen semejanzas con ninguno, debido a la capacidad de los mismos (1750 L). (Anexo 5.2)

### **3.4 Determinación de si las variables operacionales se encuentran o no bajo control.**

Para determinar si las variables operacionales se encuentra bajo control se realizan las cartas de control para medias, para ello se toman los datos de los fermentadores por separados. En el Anexo 6 se muestran estos gráficos.

A continuación se realiza un análisis de las cartas de control por fermentador.

- Fermentador 1.

La temperatura y la velocidad se encuentran fuera de control, pues presenta puntos por debajo o por encima de los límites inferiores y superiores respectivamente, sin

embargo, se debe señalar que en el caso de la temperatura estos puntos se encuentran dentro de las especificaciones operacionales, pero en la velocidad existen valores inferiores a la norma (90 rpm), lo cual es debido a la presencia de espuma por lo que se hace necesario disminuirla.

#### - Fermentador 2.

La carta de control para la temperatura solo presenta un punto por debajo del límite inferior, pero el mismo está en el rango de operación establecido, por lo que se considera que el proceso está bajo control.

Sin embargo, con respecto a la velocidad todos los puntos están fuera de los límites, por lo que esta variable no está bajo control, ni cumple con las especificaciones. Se debe señalar que este fermentador solo trabajó una vez en el período de estudio, en estos momentos está con rotura.

#### - Fermentador 3.

En este fermentador la temperatura a pesar de presentar puntos fuera de los límites de la carta de control, se considera que la variable está bajo control, pues los mismos se encuentran dentro de los rangos establecidos.

En el caso de la velocidad los puntos que están por debajo y por encima de los límites inferiores y superiores respectivamente de la carta de control, también se encuentran fuera del rango operacional establecido, lo cual se debe a la presencia de espuma en el medio de desarrollo de los microorganismos. Por esto se considera que con respecto a esta variable, el fermentador está fuera de control.

#### - Fermentador 4.

La carta de control para la temperatura muestra puntos por fuera de los límites. En el caso de los puntos que están por debajo del límite inferior, esto se debe a que en algunos momentos del proceso falta la corriente eléctrica por lo que disminuye la temperatura, lo que puede afectar la calidad del proceso.

En la velocidad ocurre lo mismo, se debe señalar que en ningún momento se alcanza valores superiores al límite inferior requerido en el proceso (90 rpm), por lo que este fermentador está fuera de control. Esto se debe a la presencia de espuma y a que en este fermentador se trabaja con mayores volúmenes.

- Fermentador 5.

En este fermentador la temperatura a pesar de presentar puntos fuera de los límites de la carta de control, se considera también que la variable está bajo control, pues los mismos se encuentran dentro de los rangos establecidos.

En el caso de la velocidad existen puntos que están por debajo de los límites inferiores, los cuales no cumplen con las especificaciones de operación. Esto se debe a la presencia de espuma y a que en este fermentador se trabaja con mayores volúmenes.

### **3.5 Análisis estadístico para los parámetros de calidad del producto final.**

Los datos recopilados de estos parámetros se muestran en el Anexo 7.

Para realizar un análisis de los parámetros de calidad (concentración y viabilidad) se separan los datos en dos grupos, según el microorganismo a producir.

#### **3.5.1 Caracterización estadística de la concentración y la viabilidad del producto final.**

En Tabla 3.5 se muestra la caracterización estadística de estos parámetros de calidad para los microorganismos *Bacillus Thuringiensis* y *Trichoderma* respectivamente.

**Tabla 3.5 Caracterización estadística de los parámetros de calidad.**

Parámetro estadístico	Concentración (conidios/mL)		Viabilidad (%)	
	Bt	TS3	Bt	TS3
n	17	25	17	25
$\bar{X}$	1,65 E9	5,82 E8	96,0	95,04
S <sup>2</sup>	2.66 E18	7.73 E17	3.37	2.54
S	1,63 E9	8,79 E8	1,84	1,60
Mín	1,8 E8	1,0 E6	90.0	90.0
Máx.	5,0 E9	3,0 E9	98.0	97.0
C.S	1.55	3.56	-4.04	-2.34
C.K	-0.44	2.16	5.92	2.85
C.V (%)	99	151	2.0	2.0

La concentración final de *Bacillus Thuringiensis* en el período comprendido entre 2007 y 2009 tiene un valor medio de 1.65 E9 conidios/mL, el coeficiente de variación es de 99 %, indicando que esta muestra presenta una dispersión grande, es decir, que los datos no están agrupados alrededor de la media, lo cual se debe a que esta variable es numéricamente elevada (con exponenciales), y presenta un rango de 4.9 E9. Al realizar el histograma de frecuencia relativa se observa que el 58.82 % se encuentra entre 1.E7 y 1.208E9 conidios/mL, dentro del cual está comprendido el valor medio. La viabilidad en este microorganismo presenta una media de 96 %, la cual es muy representativa de la muestra pues presenta un coeficiente de variación de 2 %. Se debe destacar que al agrupar los datos en 5 clases, la mayoría de estos (63.26 %) se encuentran dentro del rango de 95 y 97 %, siendo superior al valor mínimo requerido para la obtención de este biopreparado con calidad.

La concentración media del biopreparado *Trichoderma* es igual a 5.82E8, la cual no es representativa de los datos pues la muestra presenta un coeficiente de variación de 151 %, esto se debe a los explicados anteriormente para el Bt. El 72 % de los datos se encuentra dentro del intervalo de 9E5 – 6.21E8 conidios/mL.

Al analizar la muestra de la viabilidad para TS3 se observa que la media de la misma (95.04 %) es muy representativa de los datos pues presenta un coeficiente de variación igual a 2 %. El intervalo en el que se encuentran la mayoría de los valores (76 %) es entre 92 y 96 %, siendo superiores al valor mínimo requerido para obtener un producto con calidad. (Ver Anexo 8)

### 3.5.2 Prueba de normalidad para los parámetros de calidad.

A continuación se relacionan estos parámetros para cada producto final.

- Valores de h para la concentración y la viabilidad del microorganismo Bt.

Concentración Bt:  $n = 17$      $\bar{x} = 1.65E9 \text{ conidos/ml}$      $S = 1.63E9 \text{ conidos/ml}$      $h = 2.48$

Viabilidad Bt:  $n = 17$      $\bar{x} = 99.0\%$      $S = 1.84\%$      $h = 2.48$

- Valores de h para la concentración y viabilidad del microorganismo TS3.

Concentración TS3:

$n = 25$      $\bar{x} = 5.82E8 \text{ conidos/ml}$      $S = 8.79E8 \text{ conidos/ml}$      $h = 2.87$

Viabilidad TS3:  $n = 25$      $\bar{x} = 95.04\%$      $S = 1.60\%$      $h = 2.87$

En el Anexo 7 se muestran los resultados al aplicar esta norma a los datos de las variables operacionales, en dependencia del microorganismo a producir. Como se puede observar en ninguna de las muestras existen valores anormales, por lo que se puede definir que las mismas presentan una distribución normal.

### 3.6 Análisis del cumplimiento de las especificaciones de calidad en los parámetros del producto final.

Para determinar si los parámetros concentración y viabilidad en los microorganismos cumplen con las especificaciones de operación se realizan pruebas de hipótesis.

El tipo de prueba de hipótesis aplicada es la de t-student, donde se pueden tener en cuenta dos criterios de selección de la hipótesis verdadera, los cuales fueron explicados anteriormente. Todas las pruebas en este trabajo se realizan para un 95 % de confianza ( $\alpha=0.05$ ). En la Tabla 3.6 se muestran los resultados de estas pruebas de hipótesis.

Como se observa, a pesar de los problemas de operación existentes en el proceso, el producto final cumple con las especificaciones de calidad, en cuanto a las variables analizadas en este trabajo, esto se debe a que en la planta se toman medidas que permitan disminuir o eliminar las afectaciones en la calidad.

**Tabla 3.6 Resultados de las pruebas de hipótesis para los parámetros de calidad del producto final.**

Parámetros de calidad	Microorganismo	Hipótesis	$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{tabulado}}$	p-value
Concentración Conidos/mL	Bt	$H_0: \mu \geq 10E8$ $H_1: \mu < 10E8$	1.64	1.746	0.94
	TS3	$H_0: \mu \geq 10E8$ $H_1: \mu < 10E8$	-2.37	1.711	0.99
Viabilidad %	Bt	$H_0: \mu \geq 90$ $H_1: \mu < 90$	13.46	1.746	1.0
	TS3	$H_0: \mu \geq 90$ $H_1: \mu < 90$	15.81	1.711	1.0

### 3.7 Comparación de los parámetros de calidad en dependencia del microorganismo producido.

Para determinar si existen diferencias significativas en los parámetros de calidad entre los microorganismos producidos se realiza un Análisis de Varianza Unifactorial.

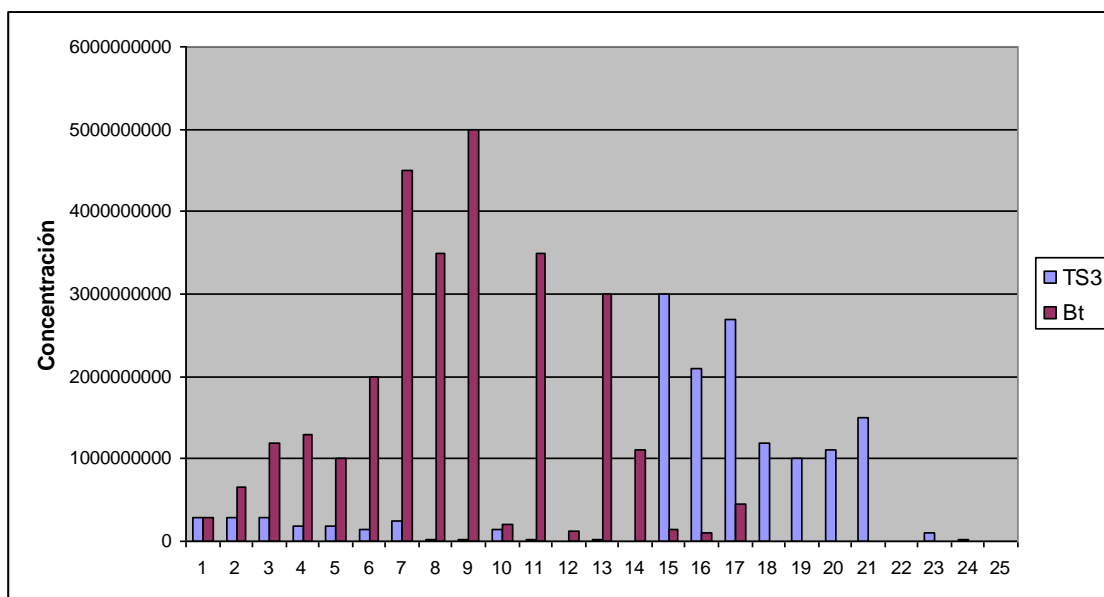
En el Anexo 9 se muestran los resultados de esta prueba y en la Tabla 3.7 se refleja un resumen de los mismos.

**Tabla 3.7 Resumen de los resultados del Análisis de varianza para los parámetros de calidad.**

Parámetros de calidad	p-value	F <sub>calculada</sub>	F <sub>tabulada</sub>	Existencia de diferencias significativas
Concentración (conidos/mL)	0.009	7.56	5.42	Sí
Viabilidad (%)	0.08	3.24	5.42	No

Como se observa no existen diferencias significativas en la viabilidad en cuanto al microorganismo producido. Sin embargo, para la concentración el p-value es menor que 0.05, indicando la existencia de diferencias significativas entre los dos biopreparados para un 95 % de confianza, además la  $F_{calculada} > F_{tabulada}$ .

Se realiza un gráfico de tendencia de la concentración, según el tipo de microorganismo (Figura 3.1), donde se observa que el Bt se produce con una mayor concentración, es decir, mejor calidad, lo cual se debe a que este producto es una bacteria, que tiene mayor resistencia que el TS3 (hongo).



**Figura 3.1 Comportamiento de la concentración de los microorganismo TS3 y Bt.**



### **3.8 Determinación de si los parámetros del producto final se encuentran o no bajo control.**

Para determinar si los parámetros de calidad se encuentran bajo control, se realizan las cartas de control para medias, para ello se toman los datos por microorganismos. En el Anexo 10 se muestran estos gráficos.

Las cartas de control para la viabilidad en los dos microorganismos se encuentran bajo control. Sin embargo, en el caso de la concentración existe un punto para cada uno por encima del límite superior, pero esos valores son mayores que el mínimo requerido en las especificaciones de calidad ( $10^8$  conidios/mL), por lo que se considera que están bajo control.

### **3.9 Conclusiones parciales del capítulo.**

Después de analizar los resultados obtenidos en el procesamiento estadístico de las muestras de las variables operacionales en los fermentadores y de los parámetros de calidad de los microorganismos Bt y TS3, se pueden llegar a las conclusiones siguientes:

- No existen en ninguna de las variables dispersión en los datos, es decir, las medias son representativas de las muestras.
- En ninguna de las muestras se identifican datos anormales, por lo que estas presentan un comportamiento normal.
- La temperatura en los fermentadores cumple con las especificaciones requeridas, sin embargo, la velocidad de agitación no cumple con la norma en los fermentadores 1, 3 y 4, pues no supera el límite inferior requerido, lo cual se debe a la formación de espuma en la etapa de crecimiento de estos microorganismos.
- No existen diferencias significativas entre la temperatura en los fermentadores 1 y 3, sin embargo, con respecto a la velocidad, sólo son homogéneos 1, 2 y 3.
- A pesar de existir puntos fuera de los límites en la carta de control para la temperatura, estos se encuentran dentro de los rangos establecidos por la

norma, porque se considera que esta variable está bajo control, no ocurriendo lo mismo para la velocidad de agitación.

- Los parámetros de calidad concentración y viabilidad cumplen los requisitos establecidos para los dos microorganismos estudiados.
- Existen diferencias significativas entre la concentración para los dos productos, obteniéndose con mayor calidad el Bt.
- Las cartas de control para la viabilidad en los dos microorganismos están bajo control, en el caso de la concentración solo un valor está por encima del límite superior, pero no es una gran diferencia por lo que se considera bajo control.

## *Conclusiones*

1. Al realizar las pruebas de hipótesis se determina que la temperatura en los fermentadores cumple con la norma, no ocurriendo así con la velocidad de agitación.
2. Los parámetros concentración y viabilidad cumplen con las especificaciones requeridas para obtener un producto con calidad.
3. En la Empresa Fitosanitaria Provincial de Matanzas, se producen tres tipos de biopreparados: Bt, TS3 y Bb, este último se ha producido muy poco.
4. En las muestras analizadas no existen datos anormales.
5. Los fermentadores no trabajan de forma homogénea según las variables operacionales.
6. Las variables temperatura, concentración y viabilidad se consideran bajo control, no ocurriendo lo mismo con la velocidad de agitación.
7. Existen diferencias significativas en la concentración de los microorganismos Bt y TS3, obteniéndose más concentrado el primero.

## *Recomendaciones*

Se recomienda a la Empresa Fitosanitaria Provincial de Matanzas (Sanidad Vegetal):

- Realizar un estudio de cómo influye la disminución de la velocidad de agitación en los fermentadores en el proceso de obtención de los microorganismos, sobre la calidad del producto.
- Analizar de forma periódica muestras de las variables operacionales y de los parámetros de calidad, con ayuda de herramientas estadísticas, para valorar y evaluar la calidad del proceso.

## *Bibliografía*

1. Aronson, A. I., Beckman, W. y P. Dunn (1986). "Bacillus thuringiensis and related Insect pathogens." Microbiology **50**(1-24).
2. BONNIER, M. (2004). "Help for Statiscope." Technology.
3. Cabe, p., Hernando Dominguez, Antonio Jaco (2005). "Bacillus thuringiensis subsp. Israeliensis Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor."
4. Carballo, M. (2005). Manejo Integrado de Plagas en Hortalizas.
5. Carreras, B. (2003). características y propiedades de Bacillus Thuringiensis para el control fitosanitario, Universidad de Havana.
6. CEN (1979). NC 92-21:79: Control de Calidad. Procedimiento para Evaluar la Anormalidad de las Observaciones., Comité Estatal de Normalización (Cuba).
7. Copping, L. (2001). "The Biopesticide Manual: World Compendium." British Crop Protection Council **2nd Edition**: pp. 1-528.
8. EILON, S. (1969). Reader in Production Engineering, Imperial College of Ciencia and Technilogy London.
9. Elosegui, O., C.S. Hernández-Rodríguez y J. Ferré (2006). métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas.
10. EPA (2003). "conceptos de los bioplaguicidas disponible en Internet [www.epa.gov/pesticidas/biopesticidas/factsheets](http://www.epa.gov/pesticidas/biopesticidas/factsheets)."
11. Fabian, E. (2002). características biológicas y moléculas de aislamientos del hongo entomopatógeno *Bauveria Bassiana*.
12. Ferre, j. (2008). "Bacillus Thuringiensis y sus aplicaciones en la protección frente al ataque de insectos." Actas de Horticultura **51**(213-219).
13. Gelernter, W. D. E., H. F. (1999). "Factors in the Success and Failure of Microbial Insecticides." **4**(279-316.).
14. GOLDBERG, J. E. B., K., et al., (2003). Statistical Analysis. The Gnumeric Manual. GNOME Documentation Project.
15. González, J. (2009). Control de calidad en procesos.

16. Harman, G., E (2006). "Descripción de mecanismos y aplicaciones de trichoderma spp." Phytopathology **96**: 190-194.
17. Hu, G. a. R. S. L. (2002). Field studies using a recombinant mycoinsecticide (Metarhizium anisopliae) reveal that it is rhizosphere competent.
18. Jack, H. (2003). Engineer On A Disk - Quality Control Grand Valley State University, Allendale, MI (USA), disponible en internet <<http://claymore.engineer.gvsu.edu/eod/pdf/quality.pdf>>.
19. Larrea, F. (2000). tecnología para la producción de biopesticidas a base de microorganismo Berliner y su control de calidad.
20. López, J. (2005). Manejo Integrado de Plagas en Hortalizas.
21. LOWRY, R. (2004). "Concepts and Applications of Inferential Statistics."
22. Mantilla, A., Ed. (2004). Identificación y caracterización de genes responsables de la patogenicidad de /Beauveria bassiana.
23. México, a. d. (2009).
24. Monzón, A. (2001). producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos.
25. Norte, A. (2010). "la primera revista digital multilingüe gratuita disponible en internet [www.spainbonsai.com](http://www.spainbonsai.com)."
26. Orestes, E. (2002). Características que deben observarse para identificar las principales especies de hongos entomopatógenos. pequeña Biblioteca CREE.
27. Soberón, M. (1998). Characterization of cry genes in a Mexican Bacillus thuringiensis strain collection.
28. Vega, L. (2002). "microorganismos antagonista para el control fitosanitario." manejo integrado de plagas: 96-100.
29. WEST, R., WU, Y y HEYDT, D (2004). "An Introduction to StatCrunch 3.0." Statistical Software.

# ANEXOS

## Anexo 1. Tabla de definiciones de los bioplaguicidas, según algunos países.

Austria	Micro y macro-organismo (plaguicida biológico no definido).
Dinamarca	Los plaguicidas biológicos incluyen solo organismo vivos (micro, macro-organismo, plantas transgénicas). En comparación, los semio-químicos y otros productos derivados de plantas son reconocidos como plaguicidas químicos.
Finlandia	No hacen mención específica. Micro-organismo incluyendo virus de acuerdo a la ley de la UE, de otra manera son considerados como plaguicidas.
Francia	Como UE
Alemania	Micro-organismo incluyendo virus. Otros agentes están regulados como plaguicidas químicos pero con requerimiento muchos más leves.
Italia	7 categorías de mico-organismo, feromonas, reguladores del crecimiento de insectos, reguladores del crecimiento vegetal, extractos de plantas, macro-organismo, plantas transgénicas.
Países bajos	Micro-organismo incluyendo virus. Los otros considerados plaguicidas. Macro-organismo, plantas transgénicas están fuera del acta de plaguicidas.
Suecia	Solo organismo vivos: micro-organismo, virus, nematodos, insectos, arañas.

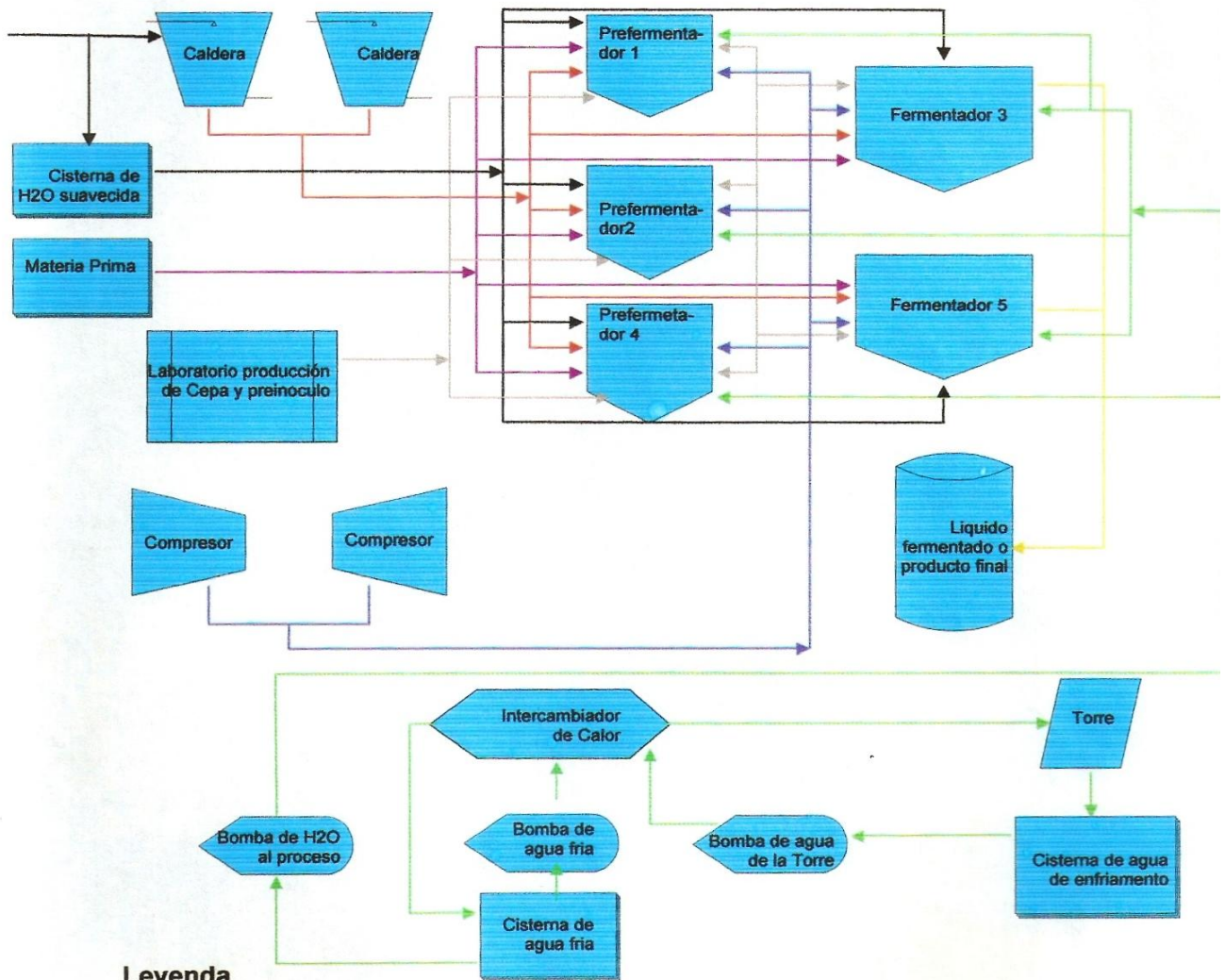
Uk	Micro-organismo y semio-químicos. Plantas transgénicas no están bajo el acta de plaguicidas.
Australia	Químicos derivados biológicamente con toxicidad directa o indirecta, microbiales, y otros organismos vivos.
OECD	Entidad biológica viva o de origen natural. micro-organismo, feromonas, reguladores del crecimiento de insectos, reguladores del crecimiento vegetal, extractos de plantas, macro-organismo, plantas transgénicas.
FAO	<p>Agentes biológicos de control de plagas de origen natural o genéticamente modificados. Tienen modos únicos de acción, son utilizados en bajas cantidades y son específicos en el ataque de especies.</p> <p>1. Agentes bioquímicos de control de plagas (sin toxicidad directa y de natural: semio-químico, hormonas, reguladores naturales de plantas y reguladores del crecimiento de insectos, enzimas.</p> <p>2. Agentes microbiales para el control de plagas: bacterias, hongos, virus y protozoos o micro-organismo genéticamente modificados.</p>
MERCOSUR (Brasil, Argentina, Uruguay, y Paraguay)	Plaguicidas biológicos, se entienden en términos de origen y función, como un agente biológico de producción artificial, normalmente un patógeno formulado y aplicado para la rápida reducción y control de plagas.



## Anexo 2. Diagrama de flujo del proceso.

Anexos

Diagrama de la planta:



### Leyenda

- Línea roja: →, Agua caliente
- Línea verde: Agua fría
- Línea azul: Vapor
- Línea violeta: Materia prima
- Línea gris: La ceba
- Línea Negra: Agua suavificada
- Línea amarilla: Producto

### Anexo 3 Resultados del procedimiento para determinar datos anormales de las variables operacionales.

#### Temperatura en el fermentador1

xi	ti	criterio	xi	ti	criterio	xi	ti	criterio
31.9	1.6850394	normal	30.5	0.58268	normal	30	0.18898	normal
31.2	1.1338583	normal	30	0.18898	normal	30	0.18898	normal
30.7	0.7401575	normal	30	0.18898	normal	29	-0.5984	normal
30.3	0.4251969	normal	30	0.18898	normal	29	-0.5984	normal
29.6	-0.125984	normal	28.8	-0.7559	normal	30	0.18898	normal
29	-0.598425	normal	30	0.18898	normal	30	0.18898	normal
28.4	-1.070866	normal	28.8	-0.7559	normal	31	0.97638	normal
30.9	0.8976378	normal	30	0.18898	normal	31	0.97638	normal
30.2	0.3464567	normal	30	0.18898	normal	31	0.97638	normal
29.3	-0.362205	normal	28.5	-0.9921	normal	30	0.18898	normal
28.9	-0.677165	normal	27.5	-1.7795	normal	30	0.18898	normal
31	0.976378	normal	28.7	-0.8346	normal	30	0.18898	normal
30.3	0.4251969	normal	31.8	1.6063	normal	30	0.18898	normal
29.8	0.0314961	normal	31.1	1.05512	normal	30	0.18898	normal
31.05	1.015748	normal	31.1	1.05512	normal	30	0.18898	normal
31.05	1.015748	normal	30.8	0.8189	normal	30	0.18898	normal
31.05	1.015748	normal	30.4	0.50394	normal	30	0.18898	normal
30	0.1889764	normal	30.4	0.50394	normal	30	0.18898	normal
30	0.1889764	normal	30.8	0.8189	normal	30	0.18898	normal
30	0.1889764	normal	30.6	0.66142	normal	30	0.18898	normal
30	0.1889764	normal	30.2	0.34646	normal	30	0.18898	normal
30	0.1889764	normal	29.9	0.11024	normal	30	0.18898	normal
29.1	-0.519685	normal	29.8	0.0315	normal	30	0.18898	normal
30	0.1889764	normal	30.1	0.26772	normal	30	0.18898	normal
30	0.1889764	normal	30.1	0.26772	normal	30	0.18898	normal
30	0.1889764	normal	32	1.76378	normal	30	0.18898	normal
30	0.1889764	normal	31	0.97638	normal	30	0.18898	normal
30	0.1889764	normal	31	0.97638	normal	30	0.18898	normal
26	-2.96063	normal	30.8	0.8189	normal	29.4	-0.2835	normal
26	-2.96063	normal	30.2	0.34646	normal	29	-0.5984	normal
25.9	-3.03937	normal	30	0.18898	normal	27.4	-1.8583	normal
25.9	-3.03937	normal	29.4	-0.2835	normal	27.4	-1.8583	normal
25.9	-3.03937	normal	30.9	0.89764	normal	28.6	-0.9134	normal
24.2	-4.377953	normal	29.4	-0.2835	normal	27.5	-1.7795	normal
29.5	-0.204724	normal	29	-0.5984	normal	30.1	0.26772	normal
23.5	-4.929134	normal	28.5	-0.9921	normal	30.5	0.58268	normal

32	1.7637795	normal	30.4	0.50394	normal	30	0.18898	normal
32	1.7637795	normal	29.6	-0.126	normal	30	0.18898	normal
30	0.1889764	normal	29.1	-0.5197	normal	30	0.18898	normal
29.6	-0.125984	normal	28.5	-0.9921	normal	30	0.18898	normal
29.9	0.1102362	normal	31.2	1.13386	normal	30	0.18898	normal
29.5	-0.204724	normal	29.8	0.0315	normal	30	0.18898	normal
29.7	-0.047244	normal	29.4	-0.2835	normal	29.8	0.0315	normal
29.7	-0.047244	normal	30.6	0.66142	normal	29.8	0.0315	normal
30.5	0.5826772	normal	28.7	-0.8346	normal	29.7	-0.0472	normal
30	0.1889764	normal	29.7	-0.0472	normal	29.7	-0.0472	normal
30.5	0.5826772	normal	28	-1.3858	normal	29.6	-0.126	normal
29.5	-0.204724	normal	28.7	-0.8346	normal	29.1	-0.5197	normal
29.8	0.0314961	normal	30.6	0.66142	normal	29	-0.5984	normal
29.3	-0.362205	normal	31.2	1.13386	normal	30.6	0.66142	normal
28.6	-0.913386	normal	28.4	-1.0709	normal	30	0.18898	normal
30.6	0.6614173	normal	29.9	0.11024	normal	29.6	-0.126	normal
30.2	0.3464567	normal	28.1	-1.3071	normal	29.1	-0.5197	normal
30	0.1889764	normal	31.3	1.2126	normal	31	0.97638	normal
29.5	-0.204724	normal	29.2	-0.4409	normal	31	0.97638	normal
30.8	0.8188976	normal	28	-1.3858	normal	31	0.97638	normal
28.1	-1.307087	normal	31.4	1.29134	normal	31	0.97638	normal
31	0.976378	normal	29.5	-0.2047	normal	31	0.97638	normal
31	0.976378	normal						

### Temperatura en el fermentador2

xi	ti	criterio	xi	ti	criterio	xi	ti	criterio
29.8	0.6415	normal	29.1	-0.0189	normal	29.8	0.6415	normal
29.8	0.6415	normal	29	-0.1132	normal	28.7	-0.3962	normal
29.6	0.4528	normal	28.9	-0.2075	normal	30.1	0.9245	normal
29.5	0.3585	normal	30.3	1.1132	normal	28.9	-0.2075	normal
29	-0.1132	normal	29	-0.1132	normal	29	-0.1132	normal
29	-0.1132	normal	28.9	-0.2075	normal	28.7	-0.3962	normal
28.9	-0.2075	normal	28.6	-0.4906	normal	29	-0.1132	normal
28.6	-0.4906	normal	30.1	0.9245	normal	29.2	0.0755	normal
29.8	0.6415	normal	29.8	0.6415	normal	30	0.8302	normal
29.5	0.3585	normal	29.2	0.0755	normal	30.5	1.3019	normal
29.1	-0.0189	normal	29.2	0.0755	normal	30.5	1.3019	normal
28.8	-0.3019	normal	29.2	0.0755	normal	29.4	0.2642	normal
28.6	-0.4906	normal	28.2	-0.8679	normal	29.4	0.2642	normal
29.8	0.6415	normal	30.3	1.1132	normal	28.7	-0.3962	normal
29.8	0.6415	normal	29.7	0.5472	normal	27.1	-1.9057	normal
29.8	0.6415	normal	30.5	1.3019	normal	25.8	-3.1321	normal

25.8 -3.1321 normal  
 25.8 -3.1321 normal

### Temperatura en el fermentador3

xi	ti	criterio	xi	ti	criterio	xi	ti	criterio
30	-0.04	normal	30.2	0.25	normal	30.9	1.30	normal
29.3	-1.09	normal	30.3	0.40	normal	30	-0.04	normal
29.6	-0.64	normal	30.5	0.70	normal	30	-0.04	normal
29.4	-0.94	normal	30.5	0.70	normal	30	-0.04	normal
28.8	-1.84	normal	30.5	0.70	normal	30	-0.04	normal
29.5	-0.79	normal	30.5	0.70	normal	30	-0.04	normal
28.1	-2.88	normal	30.5	0.70	normal	30	-0.04	normal
28.1	-2.88	normal	30.5	0.70	normal	30	-0.04	normal
29.8	-0.34	normal	30.5	0.70	normal	30.1	0.10	normal
29.8	-0.34	normal	30.5	0.70	normal	30.1	0.10	normal
30	-0.04	normal	30.5	0.70	normal	30.1	0.10	normal
29.9	-0.19	normal	30.5	0.70	normal	30.1	0.10	normal
29.9	-0.19	normal	30	-0.04	normal	30.1	0.10	normal
29.9	-0.19	normal	30	-0.04	normal	31.4	2.04	normal
29.9	-0.19	normal	30	-0.04	normal	31.2	1.75	normal
29.9	-0.19	normal	30	-0.04	normal	31	1.45	normal
29.5	-0.79	normal	30	-0.04	normal	30.9	1.30	normal
28.4	-2.43	normal	30	-0.04	normal	30.8	1.15	normal
28	-3.03	normal	29.9	-0.19	normal	30.7	1.00	normal
30.1	0.10	normal	29.8	-0.34	normal	30.7	1.00	normal
31	1.45	normal	29.6	-0.64	normal	30.6	0.85	normal
30	-0.04	normal	29.4	-0.94	normal	30.5	0.70	normal
31	1.45	normal	29.4	-0.94	normal	30.4	0.55	normal
31.2	1.75	normal	29.4	-0.94	normal	30.4	0.55	normal
31.1	1.60	normal	29.4	-0.94	normal	30.4	0.55	normal
30.8	1.15	normal	29.4	-0.94	normal	30.1	0.10	normal
30.8	1.15	normal	29.5	-0.79	normal	30	-0.04	normal
30.8	1.15	normal	29.5	-0.79	normal	30	-0.04	normal
30.8	1.15	normal	29.6	-0.64	normal	30.1	0.10	normal
31	1.45	normal	29.8	-0.34	normal	29.8	-0.34	normal
30	-0.04	normal	30	-0.04	normal	29.8	-0.34	normal
30	-0.04	normal	30.4	0.55	normal	29.6	-0.64	normal
30	-0.04	normal	30.6	0.85	normal	29.5	-0.79	normal
30	-0.04	normal	30.9	1.30	normal	30.2	0.25	normal
30	-0.04	normal	31.4	2.04	normal	30.4	0.55	normal
30	-0.04	normal	29.6	-0.64	normal	30.7	1.00	normal

30	-0.04	normal	30.9	1.30	normal	29.9	-0.19	normal
30	-0.04	normal	30.7	1.00	normal	29.7	-0.49	normal
30	-0.04	normal	30.6	0.85	normal	30	-0.04	normal
30	-0.04	normal	30.5	0.70	normal	30.1	0.10	normal
30	-0.04	normal	30.4	0.55	normal	30.1	0.10	normal
30	-0.04	normal	30.7	1.00	normal	30.2	0.25	normal
30	-0.04	normal	30.6	0.85	normal	30.2	0.25	normal
30	-0.04	normal	31	1.45	normal	30.1	0.10	normal
30	-0.04	normal	31	1.45	normal	30	-0.04	normal
30	-0.04	normal	31	1.45	normal	29.9	-0.19	normal
30	-0.04	normal	30	-0.04	normal	29.8	-0.34	normal
30	-0.04	normal	30	-0.04	normal	29.9	-0.19	normal
30	-0.04	normal	30	-0.04	normal	30.1	0.10	normal
30	-0.04	normal	30	-0.04	normal	30.4	0.55	normal
30	-0.04	normal	30	-0.04	normal	30.9	1.30	normal
30	-0.04	normal	29.4	-0.94	normal	30.1	0.10	normal
30	-0.04	normal	29.6	-0.64	normal	30.3	0.40	normal
30.5	0.70	normal	29.7	-0.49	normal	30.2	0.25	normal
30.4	0.55	normal	30	-0.04	normal	30.2	0.25	normal
30.3	0.40	normal	30	-0.04	normal	30.1	0.10	normal
30.3	0.40	normal	30	-0.04	normal	30.2	0.25	normal
30.3	0.40	normal	29.9	-0.19	normal	30.7	1.00	normal
30.2	0.25	normal	30	-0.04	normal	30.7	1.00	normal
30.2	0.25	normal	29.9	-0.19	normal	30.8	1.15	normal
30.1	0.10	normal	29.9	-0.19	normal	29.7	-0.49	normal
30.1	0.10	normal	29.9	-0.19	normal	29.7	-0.49	normal
30.1	0.10	normal	29.9	-0.19	normal	29	-1.54	normal
30	-0.04	normal	29.9	-0.19	normal	29	-1.54	normal
26.9	-4.67	normal	29.9	-0.19	normal	29.2	-1.24	normal
26.9	-4.67	normal	29.9	-0.19	normal	29.2	-1.24	normal
29.8	-0.34	normal	29.9	-0.19	normal	30	-0.04	normal
29.7	-0.49	normal	29.5	-0.79	normal	30	-0.04	normal
29.3	-1.09	normal	29.3	-1.09	normal	30	-0.04	normal
29.2	-1.24	normal	28.8	-1.84	normal	30	-0.04	normal
30.6	0.85	normal	30	-0.04	normal	30	-0.04	normal
30.6	0.85	normal	29.21	-1.22	normal	30	-0.04	normal
30.6	0.85	normal	29.1	-1.39	normal	29	-1.54	normal
30.6	0.85	normal	28.8	-1.84	normal	28.9	-1.69	normal
31	1.45	normal	28.3	-2.58	normal	28.7	-1.99	normal
31	1.45	normal	30	-0.04	normal	30.5	0.70	normal
30.8	1.15	normal	29.6	-0.64	normal	30.5	0.70	normal
30.8	1.15	normal	30	-0.04	normal	31.2	1.75	normal
30.6	0.85	normal	29.6	-0.64	normal	31.8	2.64	normal

30	-0.04	normal	29.3	-1.09	normal	31.8	2.64	normal
30	-0.04	normal	30	-0.04	normal	31	1.45	normal
30	-0.04	normal	30	-0.04	normal	29.7	-0.49	normal
30	-0.04	normal	30	-0.04	normal	27	-4.52	normal
29.8	-0.34	normal	30	-0.04	normal	30	-0.04	normal
29.8	-0.34	normal	30	-0.04	normal	30	-0.04	normal

#### Temperatura en el fermentador4

xi	ti	criterio	xi	ti	criterio	xi	ti	criterio
27,4	2,0286	normal	25,5	1,3500	normal	25,4	-0,3643	normal
25,7	1,8143	normal	25,5	1,3500	normal	25,4	-0,4357	normal
28,7	1,5643	normal	25,5	1,3500	normal	24,5	-0,4357	normal
27	1,3500	normal	25,5	1,7071	normal	24,4	-0,5071	normal
25,4	1,0643	normal	25,5	1,3500	normal	24,3	-0,6143	normal
27,4	0,8143	normal	30,7	1,3500	normal	24,4	-0,2571	normal
25,4	1,9571	normal	30,2	1,3500	normal	24,6	-0,2571	normal
27,3	1,4571	normal	28	1,3500	normal	25	-0,3643	normal
25,9	0,9571	normal	27	1,3500	normal	25	-0,4357	normal
28,1	1,6357	normal	28	1,3500	normal	25,3	-0,6143	normal
27,5	1,4929	normal	27,5	1,3500	normal	25,3	-0,1857	normal
27	1,3143	normal	27,2	1,3857	normal	24,2	-0,1857	normal
26,8	1,7071	normal	30	3,5286	normal	24,2	-0,1857	normal
25,7	1,7071	normal	28,4	3,4929	normal	24	-0,2214	normal
27,5	1,7071	normal	27	1,3500	normal	24	-0,2214	normal
27,5	1,5643	normal	27	1,3500	normal	20,6	-0,0429	normal
27,5	1,4571	normal	30,6	1,3500	normal	26,2	-0,0429	normal
27,5	1,3857	normal	29,7	1,3500	normal	25,2	-0,1143	normal
27,5	1,6357	normal	28,6	1,3500	normal	25,1	-0,1857	normal
26,5	1,2429	normal	27,5	1,7071	normal	25	-0,2571	normal
26,5	1,1000	normal	26,1	1,8500	normal	24,8	-0,3286	normal
27	0,9571	normal	28,9	0,9929	normal	23,9	-0,4000	normal
28	1,7071	normal	28	1,1000	normal	26,1	-0,4357	normal
27	1,6000	normal	27,5	1,2071	normal	25,8	-0,4357	normal
26,4	1,4214	normal	29,4	1,3143	normal	25,4	-0,4357	normal
27	1,2071	normal	28,4	1,3500	normal	25,1	-0,4357	normal
27,1	0,9929	normal	27,4	1,3500	normal	25	-0,4357	normal
26,5	0,8143	normal	25,2	1,3500	normal	24,2	-0,2571	normal
26,1	1,6714	normal	28,2	2,0286	normal	25,2	-0,3643	normal

26,1	1,4929	normal	29,5	2,0643	normal	24	-0,4357	normal
25,9	1,5286	normal	28,9	2,0286	normal	20,6	-0,4357	normal
25,9	1,5286	normal	28,4	1,9929	normal	18,5	-0,4357	normal
27,5	1,5286	normal	28	1,8857	normal	29,1	-0,4357	normal
25,9	1,5286	normal	27,5	2,0286	normal	28,6	-0,4357	normal
29,9	1,5286	normal	26,5	2,0643	normal	28	-0,4357	normal
29,9	1,5286	normal	26,1	2,0643	normal	27,4	-0,4357	normal
28,2	1,4571	normal	25,3	2,0643	normal	26,6	-0,4357	normal
30,9	1,4571	normal	29,7	1,3143	normal	25,8	-0,4357	normal
30,1	1,4571	normal	28,19	1,3143	normal	29	-0,4357	normal
29,4	1,4571	normal	28,1	1,3143	normal	28,3	-0,4357	normal
28,3	1,4571	normal	27,1	1,1000	normal	27,5	-0,4357	normal
31,9	1,5286	normal	26,2	1,0286	normal	26,6	-0,4357	normal
31,2	1,5286	normal	28,2	1,3500	normal	25,6	-0,4357	normal
30,7	1,6714	normal	26,8	1,3143	normal	28,8	-0,4357	normal
30,1	1,9214	normal	29,6	1,3500	normal	27,9	-0,4357	normal
29,5	1,1714	normal	28,8	1,3500	normal	26,9	-0,4357	normal
28,9	1,1714	normal	27	1,3500	normal	26,5	0,0286	normal
28,3	1,3143	normal	26,2	1,6714	normal	26,3	0,2786	normal
31,4	1,4214	normal	25,5	1,3500	normal	26	-0,3643	normal
31,8	1,5643	normal	24,8	1,3500	normal	26	-0,4714	normal
30	1,6357	normal	30,2	1,3500	normal	26	-0,4714	normal
29,6	1,7071	normal	29,1	1,3500	normal	25	-0,4714	normal
30	1,7786	normal	28	1,3500	normal	25	-0,4357	normal
30	1,0643	normal	27	1,7071	normal	25	-0,4000	normal
30	1,1357	normal	26,5	1,7071	normal	24	-0,4000	normal
30	1,1714	normal	24,5	1,8857	normal	24,3	-0,3643	normal
30	1,2429	normal	29,4	0,9929	normal	24,3	-0,3643	normal
20	1,2786	normal	16	1,0286	normal	24,7	-0,3643	normal
20	1,3143	normal	17,3	1,0643	normal	24,3	-0,3286	normal
20	1,3500	normal	26,5	1,1714	normal	24	-0,4357	normal
19	0,9571	normal	26,1	1,2071	normal	25,5	-0,4357	normal
19	0,9929	normal	26	1,2071	normal	24	-0,4357	normal
19	1,0643	normal	25,8	1,3500	normal	25	-0,4357	normal
19	0,9929	normal	29,5	1,3500	normal	25	-0,4357	normal
19	0,9214	normal	23,6	1,3500	normal	24,6	-0,4357	normal
19	1,9571	normal	28	1,3500	normal	24	1,3500	normal
19	1,8857	normal	28,2	1,3500	normal	24	-9,3643	normal
19	1,8143	normal	27,5	1,3500	normal	24	-9,3643	normal
19	1,7071	normal	27,3	1,3500	normal	26	-9,3643	normal
19	1,6357	normal	27	1,3500	normal	25,4	-9,3643	normal

19	1,5286	normal	26	1,3500	normal	24,6	-9,3643	normal
19	1,4214	normal	25,2	-0,2571	normal	24,2	-9,3643	normal
19	1,3857	normal	25	-0,3607	normal	24,1	-9,3643	normal
19	1,3857	normal	24,6	-0,4357	normal	23,7	-9,3643	normal
31,6	1,3500	normal	27	-0,4357	normal	27	-9,3643	normal
28,9	1,7071	normal	29,2	-0,4357	normal	26,7	-9,3643	normal
31,9	1,7071	normal	28	-0,4714	normal	25,9	-9,3643	normal
30,6	1,7429	normal	28	-0,5071	normal	27,3	-9,3643	normal
28,6	2,0643	normal	28	-0,5429	normal	26	-9,3643	normal
32	2,1714	normal	25	-0,6143	normal	28,9	-9,3643	normal
31,3	2,2071	normal	25,9	-0,4357	normal	27,5	-9,3643	normal
30,4	2,2429	normal	30,5	0,0286	normal	26,5	-9,3643	normal
29,4	2,2786	normal	29,6	0,1000	normal	25,1	-9,3643	normal
28,5	2,2786	normal	28,5	0,0643	normal	29	-9,3643	normal
31,9	2,2786	normal	30,5	0,0643	normal	27,8	-9,3643	normal
30,7	2,1714	normal	29,1	0,0643	normal	25,4	-9,3643	normal
29,5	2,1714	normal	28,7	0,0643	normal	28,8	-9,3643	normal
30	1,3500	normal	30,7	-0,5786	normal	28,8	-9,3643	normal
30	1,3500	normal	29,1	-0,6143	normal	27,7	-9,3643	normal
30	1,3500	normal	28,6	-0,4714	normal	20	-9,3643	normal
30	1,3500	normal	31,2	-0,3286	normal	24,6	-9,3643	normal
30	1,3500	normal	30,4	-0,1857	normal	24,3	-9,3643	normal
30	1,3500	normal	29,9	-0,0786	normal	25	-9,3643	normal
29	1,3500	normal	28,6	-0,2571	normal	25	-9,3643	normal
29	1,3500	normal	31,9	-0,4357	normal	24,6	-9,3643	normal
29	1,3500	normal	30,6	-0,4714	normal	24	-9,3643	normal
29	1,3500	normal	28,9	-0,6857	normal	25	-9,3643	normal
29	1,3500	normal	29,7	-0,2571	normal	24,5	-9,3643	normal
25,5	1,7071	normal	28,2	-0,2571	normal	24,6	-9,3643	normal
25	-9,3643	normal	26	-0,2929	normal	24,3	-9,3643	normal
24,9	-9,3643	normal	24,9	-9,3643	normal	25	-9,3643	normal
24,9	-9,3643	normal	24,7	-9,3643	normal	24,5	-9,3643	normal
24,9	-9,3643	normal	24,5	-9,3643	normal	24,7	-9,3643	normal
24,2	-9,3643	normal	25,5	-9,3643	normal	25	-9,3643	normal
24	-9,3643	normal	25,5	-9,3643	normal	25,2	-9,3643	normal
23,5	-9,3643	normal	25	-9,3643	normal	25,6	-9,3643	normal
20,9	-9,3643	normal	24,5	-9,3643	normal	25,7	-9,3643	normal
25,3	-9,3643	normal	23,3	-9,3643	normal	27	-9,3643	normal
25	-9,3643	normal	24,5	-9,3643	normal	25	-9,3643	normal
24,3	-9,3643	normal	23,7	-9,3643	normal	25	-9,3643	normal
22,5	-9,3643	normal	22,5	-9,3643	normal	25	-9,3643	normal



25,2	-9,3643	normal	25,6	-9,3643	normal	25	-9,3643	normal
23,8	-9,3643	normal	25,5	-9,3643	normal	25	-9,3643	normal
22,4	-9,3643	normal	25,6	-9,3643	normal	26	-9,3643	normal
25	-9,3643	normal	25,2	-9,3643	normal	26	-9,3643	normal
24,8	-9,3643	normal	25,2	-9,3643	normal	25	-9,3643	normal
23,3	-9,3643	normal	25,2	-9,3643	normal	25	-9,3643	normal
25	-9,3643	normal	25,2	-9,3643	normal	25	-9,3643	normal
25	-9,3643	normal	24,5	-9,3643	normal	25	-9,3643	normal
21,1	-9,3643	normal	24,5	-9,3643	normal	25	-9,3643	normal
25	-9,3643	normal	24,5	-9,3643	normal	24,8	-9,3643	normal
25	-9,3643	normal	24,5	-9,3643	normal	24,6	-9,3643	normal
24,5	-9,3643	normal	24,5	-9,3643	normal	25,8	-9,3643	normal
25	-9,3643	normal	24,5	-9,3643	normal	25,3	-9,3643	normal
25	-9,3643	normal	24,1	-9,3643	normal	25,3	-9,3643	normal
25	-9,3643	normal	24,1	-9,3643	normal	25,3	-9,3643	normal
25	-9,3643	normal	25,3	-9,3643	normal	25,3	-9,3643	normal
25	-9,3643	normal	25,3	-9,3643	normal	25	-9,3643	normal
25	-9,3643	normal						

### Temperatura en el fermentador5

xi	ti	criterio	xi	ti	criterio	xi	ti	criterio
31.9	1.26	normal	32.3	1.41	normal	24.8	-1.43	normal
31.3	1.03	normal	30	0.54	normal	24.7	-1.47	normal
30.6	0.77	normal	30	0.54	normal	24.5	-1.55	normal
30	0.54	normal	30	0.54	normal	25	-1.36	normal
29.2	0.23	normal	30	0.54	normal	26.3	-0.86	normal
28.5	-0.03	normal	30	0.54	normal	26.5	-0.79	normal
31.7	1.18	normal	30	0.54	normal	26.4	-0.83	normal
30.3	0.65	normal	30	0.54	normal	26.4	-0.83	normal
28.9	0.12	normal	30	0.54	normal	26.4	-0.83	normal
30.8	0.84	normal	30	0.54	normal	26.4	-0.83	normal
30.4	0.69	normal	30	0.54	normal	24.6	-1.51	normal
29.9	0.50	normal	30	0.54	normal	24.5	-1.55	normal
31	0.92	normal	31	0.92	normal	24.9	-1.39	normal
31	0.92	normal	30	0.54	normal	25.3	-1.24	normal
31	0.92	normal	30	0.54	normal	25.7	-1.09	normal
30.6	0.77	normal	30	0.54	normal	26	-0.98	normal
30.3	0.65	normal	31	0.92	normal	25.5	-1.17	normal
30.1	0.58	normal	30	0.54	normal	25	-1.36	normal
30.8	0.84	normal	30	0.54	normal	24.9	-1.39	normal

29.7	0.42	normal	30	0.54	normal	24.3	-1.62	normal
29.3	0.27	normal	30	0.54	normal	25.5	-1.17	normal
28.9	0.12	normal	30	0.54	normal	25.5	-1.17	normal
31	0.92	normal	30	0.54	normal	25.4	-1.20	normal
30.7	0.80	normal	30	0.54	normal	25.2	-1.28	normal
30.2	0.61	normal	30.1	0.58	normal	25	-1.36	normal
29.6	0.39	normal	36.1	2.85	normal	25	-1.36	normal
29	0.16	normal	36	2.81	normal	24.8	-1.43	normal
28.5	-0.03	normal	30	0.54	normal	24.5	-1.55	normal
30.9	0.88	normal	30	0.54	normal	25.5	-1.17	normal
30.4	0.69	normal	30	0.54	normal	25.5	-1.17	normal
30.5	0.73	normal	30	0.54	normal	25.2	-1.28	normal
30.5	0.73	normal	30	0.54	normal	25	-1.36	normal
30.5	0.73	normal	31	0.92	normal	24.5	-1.55	normal
30.5	0.73	normal	31.4	1.07	normal	25.7	-1.09	normal
30.5	0.73	normal	29	0.16	normal	25.7	-1.09	normal
30.5	0.73	normal	29.3	0.27	normal	25.7	-1.09	normal
30.3	0.65	normal	29.6	0.39	normal	25.6	-1.13	normal
30.3	0.65	normal	29.9	0.50	normal	25.6	-1.13	normal
30.3	0.65	normal	30	0.54	normal	26.1	-0.94	normal
30.3	0.65	normal	30	0.54	normal	26.1	-0.94	normal
30.3	0.65	normal	30	0.54	normal	25.9	-1.02	normal
30.5	0.73	normal	31.9	1.26	normal	25.7	-1.09	normal
30.5	0.73	normal	32	1.30	normal	25.5	-1.17	normal
30.9	0.88	normal	31.9	1.26	normal	25.3	-1.24	normal
31.6	1.14	normal	31.8	1.22	normal	25.1	-1.32	normal
29.5	0.35	normal	31.5	1.11	normal	25	-1.36	normal
29.5	0.35	normal	31.9	1.26	normal	25	-1.36	normal
29.9	0.50	normal	32	1.30	normal	25	-1.36	normal
30.2	0.61	normal	32	1.30	normal	25	-1.36	normal
30.6	0.77	normal	32	1.30	normal	25	-1.36	normal
30.8	0.84	normal	29.9	0.50	normal	25.5	-1.17	normal
31	0.92	normal	29.9	0.50	normal	25.2	-1.28	normal
31.2	0.99	normal	29.9	0.50	normal	25	-1.36	normal
29.2	0.23	normal	29.3	0.27	normal	25	-1.36	normal
29.4	0.31	normal	29.1	0.20	normal	25	-1.36	normal
29.5	0.35	normal	30	0.54	normal	25	-1.36	normal
29.7	0.42	normal	29.9	0.50	normal	25	-1.36	normal
29.8	0.46	normal	30	0.54	normal	25	-1.36	normal
29.9	0.50	normal	30	0.54	normal	25	-1.36	normal
30	0.54	normal	30	0.54	normal	25	-1.36	normal
28.9	0.12	normal	30.9	0.88	normal	25	-1.36	normal
29	0.16	normal	30	0.54	normal	25	-1.36	normal

29.2	0.23	normal	30	0.54	normal	25	-1.36	normal
29	0.16	normal	30	0.54	normal	25	-1.36	normal
28.8	0.08	normal	30	0.54	normal	25	-1.36	normal
31.7	1.18	normal	30	0.54	normal	25	-1.36	normal
31.5	1.11	normal	31	0.92	normal	25	-1.36	normal
31.3	1.03	normal	31	0.92	normal	25	-1.36	normal
31	0.92	normal	31.5	1.11	normal	25	-1.36	normal
30.8	0.84	normal	29	0.16	normal	26.3	-0.86	normal
30.5	0.73	normal	29.1	0.20	normal	27	-0.60	normal
30.2	0.61	normal	29.2	0.23	normal	25.2	-1.28	normal
30.1	0.58	normal	29.5	0.35	normal	24.9	-1.39	normal
30.1	0.58	normal	29.6	0.39	normal	24.9	-1.39	normal
30	0.54	normal	29.6	0.39	normal	24.9	-1.39	normal
31	0.92	normal	30	0.54	normal	25	-1.36	normal
31	0.92	normal	30	0.54	normal	25.1	-1.32	normal
31.1	0.95	normal	30	0.54	normal	25.1	-1.32	normal
32	1.30	normal	30	0.54	normal	25.2	-1.28	normal
32.3	1.41	normal	30	0.54	normal	25.2	-1.28	normal
32.4	1.45	normal	30	0.54	normal	25.2	-1.28	normal
32.5	1.48	normal	30	0.54	normal	25.3	-1.24	normal
32.6	1.52	normal	30	0.54	normal	25	-1.36	normal
32.6	1.52	normal	30	0.54	normal	25	-1.36	normal
32.6	1.52	normal	25.5	-1.17	normal	25	-1.36	normal
32.3	1.41	normal	25.21	-1.28	normal	25	-1.36	normal
25	-1.36	normal	25	-1.36	normal	25	-1.36	normal
24.9	-1.39	normal	25	-1.36	normal	25	-1.36	normal
30	0.54	normal						

### Velocidad en el fermentador1

xi	ti	criterio	xi	ti	criterio	xi	ti	criterio
87.74	-0.06	normal	88	-0.02	normal	90.6	0.36	normal
87.74	-0.06	normal	88	-0.02	normal	90.6	0.36	normal
87.74	-0.06	normal	88	-0.02	normal	90.6	0.36	normal
87.74	-0.06	normal	88	-0.02	normal	92	0.56	normal
87.74	-0.06	normal	88	-0.02	normal	92	0.56	normal
87.74	-0.06	normal	88	-0.02	normal	92	0.56	normal
87.74	-0.06	normal	88	-0.02	normal	92	0.56	normal
87.74	-0.06	normal	94	0.85	normal	92	0.56	normal
77.74	-1.52	normal	94	0.85	normal	92	0.56	normal
77.74	-1.52	normal	94	0.85	normal	92	0.56	normal
77.74	-1.52	normal	94	0.85	normal	92	0.56	normal



### Velocidad en el fermentador2

xi	ti	criterio	xi	ti	criterio	xi	ti	criterio
80	-0.07	normal	94.5	1.99	normal	94.5	1.99	normal
80.1	-0.05	normal	94.5	1.99	normal	94.5	1.99	normal
79	-0.21	normal	94.5	1.99	normal	94.5	1.99	normal
79	-0.21	normal	94.5	1.99	normal	94.5	1.99	normal
79	-0.21	normal	94.5	1.99	normal	94.5	1.99	normal
79	-0.21	normal	94.5	1.99	normal	94.5	1.99	normal
79	-0.21	normal	94.5	1.99	normal	94.5	1.99	normal
81	0.08	normal	94.5	1.99	normal	94.5	1.99	normal
80	-0.07	normal	94.5	1.99	normal	94.5	1.99	normal
80	-0.07	normal	94.5	1.99	normal	94.5	1.99	normal
80	-0.07	normal	94.5	1.99	normal	94.5	1.99	normal
80	-0.07	normal	94.5	1.99	normal	94.5	1.99	normal
80	-0.07	normal	94.5	1.99	normal	94.5	1.99	normal
80	-0.07	normal	94.5	1.99	normal	94.5	1.99	normal
80	-0.07	normal	94.5	1.99	normal	94.25	1.96	normal
80	-0.07	normal	94.5	1.99	normal	94.55	2.00	normal
80	-0.07	normal	94.25	1.96	normal	94.35	1.97	normal
80	-0.07	normal	94.25	1.96	normal			

### Velocidad en el fermentador3

xi	ti	criterio	xi	ti	criterio	xi	ti	criterio
93	0.89	normal	87	-0.46	normal	90	0.22	normal
93	0.89	normal	87	-0.46	normal	90	0.22	normal
93.78	1.06	normal	87	-0.46	normal	90	0.22	normal
93.78	1.06	normal	87	-0.46	normal	90	0.22	normal
93.78	1.06	normal	87	-0.46	normal	90	0.22	normal
93.78	1.06	normal	91	0.44	normal	90	0.22	normal
93.78	1.06	normal	91	0.44	normal	82.19	-1.54	normal
93.78	1.06	normal	91	0.44	normal	82.19	-1.54	normal
93.78	1.06	normal	91	0.44	normal	82.19	-1.54	normal
93.78	1.06	normal	91	0.44	normal	82.19	-1.54	normal
93.78	1.06	normal	91	0.44	normal	82.19	-1.54	normal
93.78	1.06	normal	91	0.44	normal	82.19	-1.54	normal
93.78	1.06	normal	91	0.44	normal	83.31	-1.28	normal
93.78	1.06	normal	91	0.44	normal	83.31	-1.28	normal
93.78	1.06	normal	91	0.44	normal	83.31	-1.28	normal
94.5	1.22	normal	91	0.44	normal	83.31	-1.28	normal
94.5	1.22	normal	91	0.44	normal	83.31	-1.28	normal
85.4	-0.82	normal	91	0.44	normal	83.31	-1.28	normal
85.4	-0.82	normal	91	0.44	normal	83.31	-1.28	normal
85.4	-0.82	normal	91	0.44	normal	83.31	-1.28	normal

85.4	-0.82	normal	91	0.44	normal	83.31	-1.28	normal
85.4	-0.82	normal	91	0.44	normal	83.31	-1.28	normal
85.4	-0.82	normal	91	0.44	normal	83.31	-1.28	normal
85.4	-0.82	normal	91	0.44	normal	83.31	-1.28	normal
85.4	-0.82	normal	91	0.44	normal	83.31	-1.28	normal
85.4	-0.82	normal	91	0.44	normal	83.31	-1.28	normal
85.4	-0.82	normal	91	0.44	normal	83.31	-1.28	normal
100	2.46	normal	85	-0.91	normal	83.31	-1.28	normal
100	2.46	normal	85	-0.91	normal	83.31	-1.28	normal
100	2.46	normal	85	-0.91	normal	83.31	-1.28	normal
100	2.46	normal	85	-0.91	normal	88.78	-0.06	normal
100	2.46	normal	85	-0.91	normal	86.35	-0.60	normal
100	2.46	normal	85	-0.91	normal	84.59	-1.00	normal
100	2.46	normal	85	-0.91	normal	84.59	-1.00	normal
100	2.46	normal	90	0.22	normal	82.19	-1.54	normal
100	2.46	normal	90	0.22	normal	82.19	-1.54	normal
100	2.46	normal	90	0.22	normal	82.19	-1.54	normal
90	0.22	normal	90	0.22	normal	82.19	-1.54	normal
90	0.22	normal	90	0.22	normal	82.19	-1.54	normal
90	0.22	normal	90	0.22	normal	83.63	-1.21	normal
90	0.22	normal	90	0.22	normal	83.63	-1.21	normal
90	0.22	normal	90	0.22	normal	83.63	-1.21	normal
90	0.22	normal	90	0.22	normal	86.19	-0.64	normal
90	0.22	normal	90	0.22	normal	86.19	-0.64	normal
90	0.22	normal	90	0.22	normal	86.19	-0.64	normal
90	0.22	normal	90	0.22	normal	86.19	-0.64	normal
90	0.22	normal	90	0.22	normal	86.19	-0.64	normal
90	0.22	normal	96	1.56	normal	87	-0.46	normal
90	0.22	normal	97	1.78	normal	88	-0.23	normal
90	0.22	normal	97	1.78	normal	90	0.22	normal
90	0.22	normal	98	2.01	normal	90	0.22	normal
85.6	-0.77	normal	98	2.01	normal	90	0.22	normal
85.6	-0.77	normal	98	2.01	normal	90	0.22	normal
85.6	-0.77	normal	98	2.01	normal	90	0.22	normal
85.6	-0.77	normal	98	2.01	normal	90	0.22	normal
85.6	-0.77	normal	98	2.01	normal	90	0.22	normal
85.6	-0.77	normal	98	2.01	normal	90	0.22	normal
85.6	-0.77	normal	90	0.22	normal	90	0.22	normal
87.9	-0.26	normal	89	-0.01	normal	90	0.22	normal
87.9	-0.26	normal	89	-0.01	normal	90	0.22	normal
87.9	-0.26	normal	89	-0.01	normal	90	0.22	normal
87.9	-0.26	normal	89	-0.01	normal	90	0.22	normal
87.9	-0.26	normal	81.63	-1.66	normal	90	0.22	normal
87.9	-0.26	normal	81.63	-1.66	normal	90	0.22	normal

87.9	-0.26	normal	81.63	-1.66	normal	90	0.22	normal
87.9	-0.26	normal	92	0.66	normal	90	0.22	normal
90	0.22	normal	85	-0.91	normal	92	0.66	normal
90	0.22	normal	85	-0.91	normal	92	0.66	normal
90	0.22	normal	85	-0.91	normal	92	0.66	normal
90	0.22	normal	85	-0.91	normal	92	0.66	normal
90	0.22	normal	85	-0.91	normal	92	0.66	normal
90	0.22	normal	90	0.22	normal	92	0.66	normal
90	0.22	normal	90	0.22	normal	92	0.66	normal
90	0.22	normal	90	0.22	normal	80.05	-2.02	normal
90	0.22	normal	90	0.22	normal	80.05	-2.02	normal
90	0.22	normal	90	0.22	normal	80.05	-2.02	normal
90	0.22	normal	90	0.22	normal	80.05	-2.02	normal
90	0.22	normal	90	0.22	normal	80.05	-2.02	normal
90	0.22	normal	90	0.22	normal	80.05	-2.02	normal
90	0.22	normal	90	0.22	normal	80.35	-1.95	normal
90	0.22	normal	90	0.22	normal	80.35	-1.95	normal
90	0.22	normal	90	0.22	normal	80.35	-1.95	normal
90	0.22	normal	92	0.66	normal	90	0.22	normal
90	0.22	normal	92	0.66	normal	90	0.22	normal
90	0.22	normal	92	0.66	normal	90	0.22	normal
90	0.22	normal	92	0.66	normal	90	0.22	normal
90	0.22	normal	92	0.66	normal	90	0.22	normal
90	0.22	normal	92	0.66	normal	90	0.22	normal

#### Velocidad en el fermentador4

xi	ti	criterio	xi	ti	criterio	xi	ti	criterio
89.84	0.66	normal	90.55	0.75	normal	80	-0.57	normal
93.25	1.09	normal	90.55	0.75	normal	80	-0.57	normal
90.25	0.71	normal	90.55	0.75	normal	80	-0.57	normal
90.25	0.71	normal	90.55	0.75	normal	80	-0.57	normal
90.25	0.71	normal	90.55	0.75	normal	80	-0.57	normal
91.85	0.91	normal	90.55	0.75	normal	80	-0.57	normal
91.85	0.91	normal	90.55	0.75	normal	80	-0.57	normal
92.05	0.94	normal	90.55	0.75	normal	92	0.93	normal
92.05	0.94	normal	90.55	0.75	normal	98	1.68	normal
89.45	0.61	normal	89.75	0.65	normal	98	1.68	normal
89.45	0.61	normal	89.75	0.65	normal	89	0.56	normal
89.45	0.61	normal	89.14	0.57	normal	89	0.56	normal
90.64	0.76	normal	89.14	0.57	normal	89	0.56	normal
90.95	0.80	normal	89.14	0.57	normal	89	0.56	normal





## Velocidad en el fermentador5

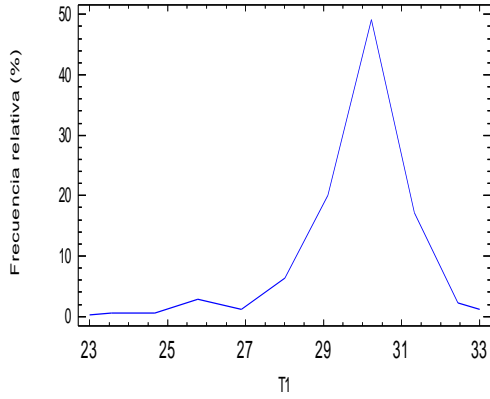
xi	ti	criterio	xi	ti	criterio	xi	ti	criterio
87.47	-0.38	normal	90	0.05	normal	80	-1.65	normal
87.47	-0.38	normal	90	0.05	normal	80	-1.65	normal
87.47	-0.38	normal	90	0.05	normal	80	-1.65	normal
87.47	-0.38	normal	90	0.05	normal	80	-1.65	normal
86.15	-0.60	normal	90	0.05	normal	80	-1.65	normal
86.15	-0.60	normal	90	0.05	normal	80	-1.65	normal
84.17	-0.94	normal	90	0.05	normal	80	-1.65	normal
84.17	-0.94	normal	90	0.05	normal	80	-1.65	normal
89.15	-0.09	normal	90	0.05	normal	91	0.22	normal
89.15	-0.09	normal	90	0.05	normal	91	0.22	normal
88.34	-0.23	normal	90	0.05	normal	91	0.22	normal
88.34	-0.23	normal	90	0.05	normal	91	0.22	normal
88.39	-0.22	normal	90	0.05	normal	91	0.22	normal
88.39	-0.22	normal	90	0.05	normal	91	0.22	normal
88.39	-0.22	normal	90	0.05	normal	93	0.56	normal
73.47	-2.76	normal	91.3	0.27	normal	93	0.56	normal
73.47	-2.76	normal	90.64	0.16	normal	93	0.56	normal
73.47	-2.76	normal	91.88	0.37	normal	93	0.56	normal
73.47	-2.76	normal	91.88	0.37	normal	93	0.56	normal
73.47	-2.76	normal	91.88	0.37	normal	93	0.56	normal
73.47	-2.76	normal	91.88	0.37	normal	93	0.56	normal
73.47	-2.76	normal	91.88	0.37	normal	93	0.56	normal
74.67	-2.56	normal	91.88	0.37	normal	93	0.56	normal
74.67	-2.56	normal	91.88	0.37	normal	99	1.59	normal
74.67	-2.56	normal	91.88	0.37	normal	99	1.59	normal
74.67	-2.56	normal	91.88	0.37	normal	99	1.59	normal
74.67	-2.56	normal	91.88	0.37	normal	99	1.59	normal
74.67	-2.56	normal	91.88	0.37	normal	99	1.59	normal
74.67	-2.56	normal	91.88	0.37	normal	99	1.59	normal
74.67	-2.56	normal	91.88	0.37	normal	99	1.59	normal
74.67	-2.56	normal	90	0.05	normal	99	1.59	normal
95.45	0.98	normal	90	0.05	normal	99	1.59	normal
95.45	0.98	normal	90	0.05	normal	99	1.59	normal
95.48	0.99	normal	90	0.05	normal	99	1.59	normal
95.48	0.99	normal	90	0.05	normal	99	1.59	normal
95.48	0.99	normal	90	0.05	normal	99	1.59	normal
95.48	0.99	normal	90	0.05	normal	99	1.59	normal
95.48	0.99	normal	90	0.05	normal	99	1.59	normal
95.48	0.99	normal	90	0.05	normal	99	1.59	normal
95.48	0.99	normal	90	0.05	normal	99	1.59	normal
95.48	0.99	normal	90	0.05	normal	99	1.59	normal
88.95	-0.13	normal	90	0.05	normal	99	1.59	normal



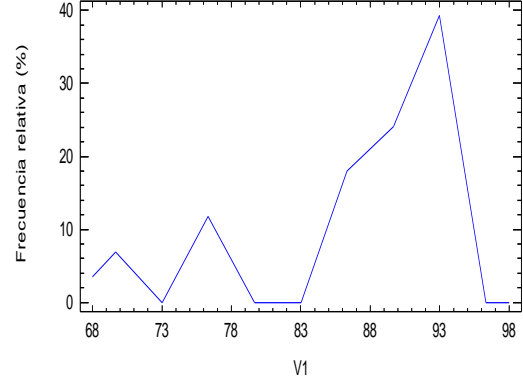
89.79	0.02	normal	80	-1.65	normal	90	0.05	normal
89.79	0.02	normal	85.39	-0.73	normal	90	0.05	normal
89.79	0.02	normal	85.39	-0.73	normal	90	0.05	normal
89.79	0.02	normal	85.39	-0.73	normal	86.44	-0.55	normal
80	-1.65	normal	80	-1.65	normal	85.39	-0.73	normal
80	-1.65	normal						

## Anexo 4. Histograma de las variables operacionales.

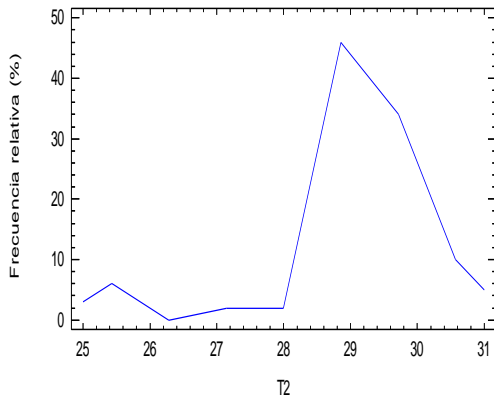
Histograma de frecuencia relativa T1



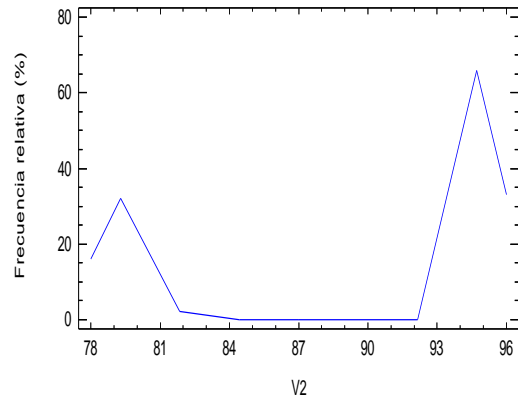
Histograma de frecuencia relativa V1



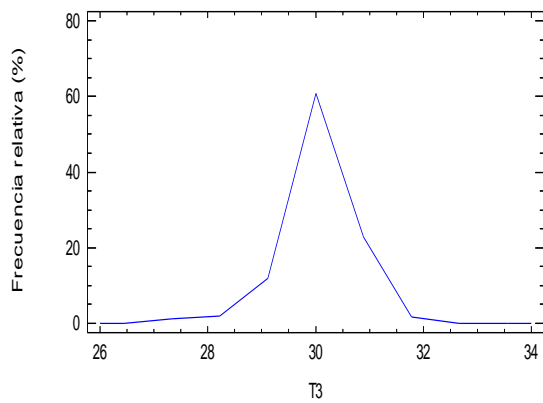
Histograma de frecuencia relativa T2



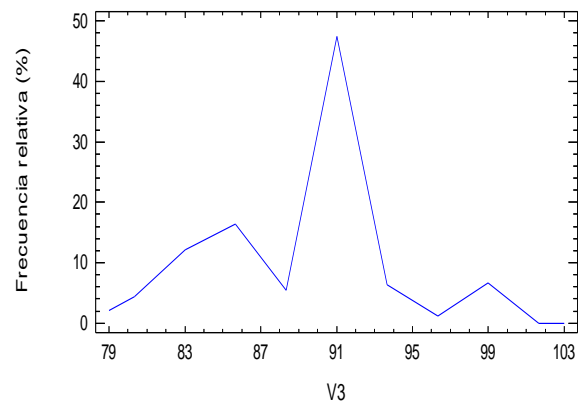
Histograma de frecuencia relativa V2



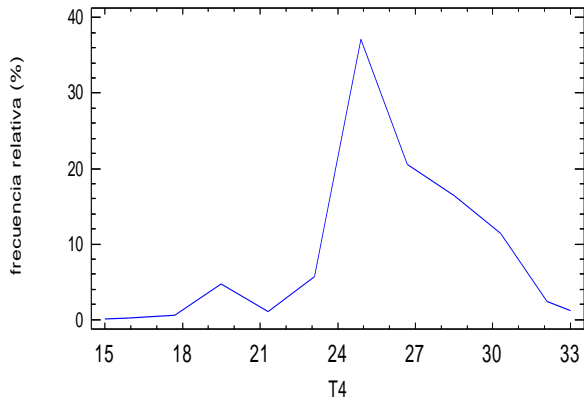
Histograma de frecuencia relativa T3



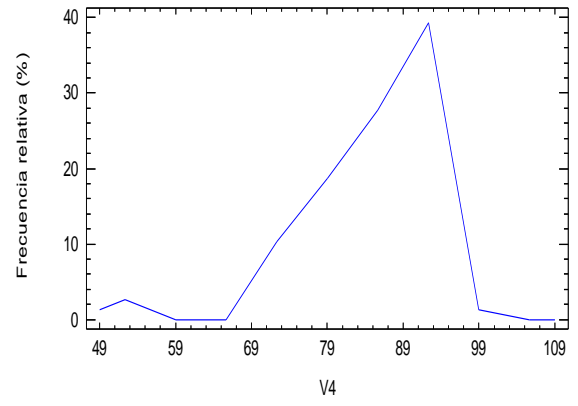
Histograma de frecuencia relativa V3



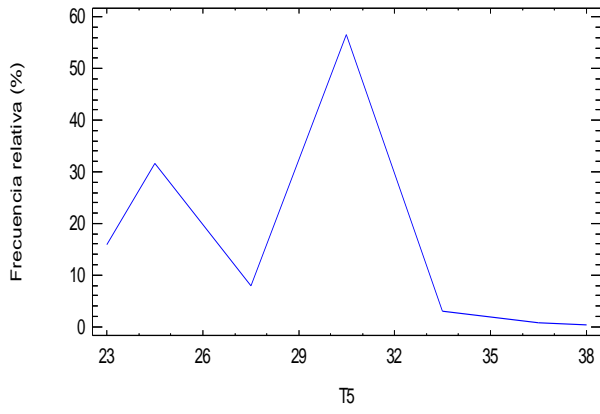
Histograma de frecuencia relativa T4



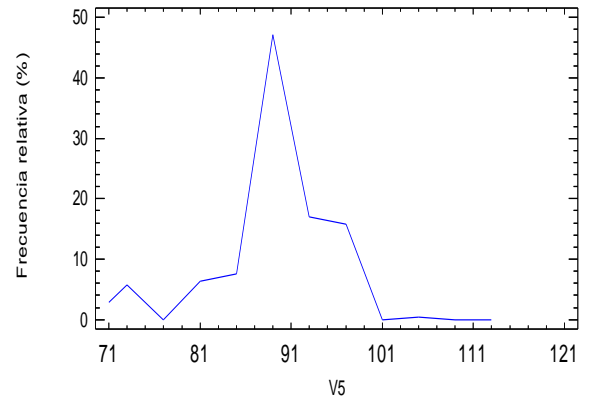
Histograma de frecuencia relativa V4



Histograma de frecuencia relativa T5



Histograma de frecuencia relativa V5



## Anexo 5. Análisis de varianza de las variables operacionales.

### Anexo 5.1. Análisis de varianza para temperatura

#### - Tabla ANOVA

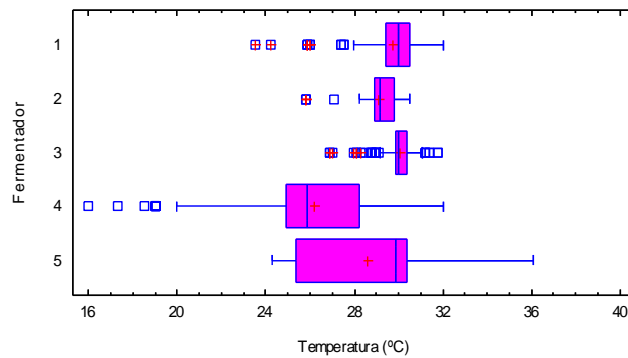
Fuente	SC	GL	CM	F <sub>calculada</sub>	P-Value
Entre grupos	2873,4	4	718,35	152,52	0,0000
Dentro de grupos	5303,86	1125	4,71		
Total (Corr.)	8177,26	1129			

#### - Prueba de múltiple rango

Método: Duncan 95,0 %

Fermentador	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
4	385	26,22	X
5	265	28,58	X
2	50	29,12	X
1	175	29,76	X
3	255	30,03	X

Diagrama de Box-Whisker



## Anexo 5. Continuación

### Anexo 5.2. Análisis de varianza para velocidad

#### Tabla ANOVA.

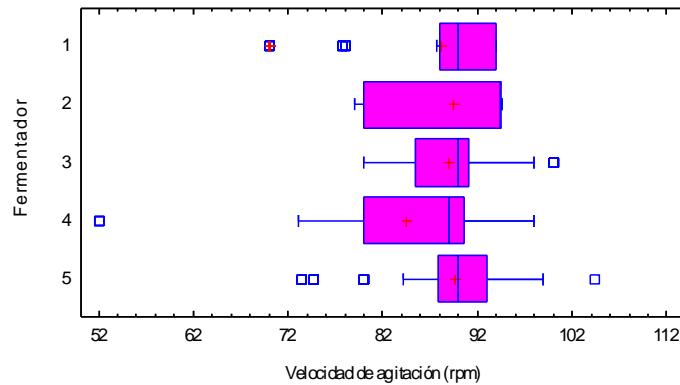
Fuente	SC	GL	CM	F <sub>calculada</sub>	P-Value
Entre grupos	2888,12	4	72,03	18,79	0,0000
Dentro de grupos	33237,9	865	38,42		
Total (Corr.)	36126,1	869			

#### Prueba de múltiple rango.

Método: Duncan 95,0 %

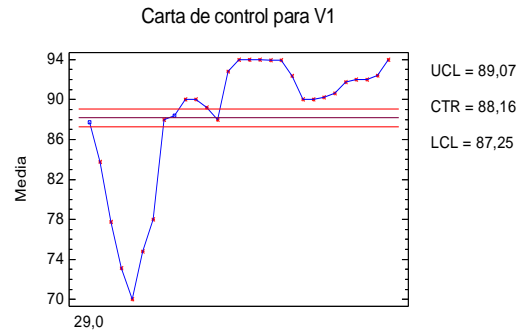
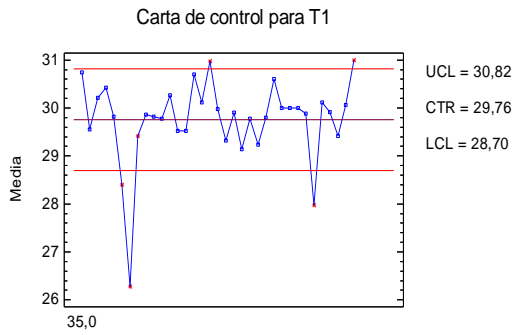
Fermentador	Cantidad	Media	Grupos Homogéneos
4	369	84,56	X
1	145	88,16	X
3	255	89,04	X
2	50	89,47	X
5	264	89,69	X

Diagrama de Box-Whisker

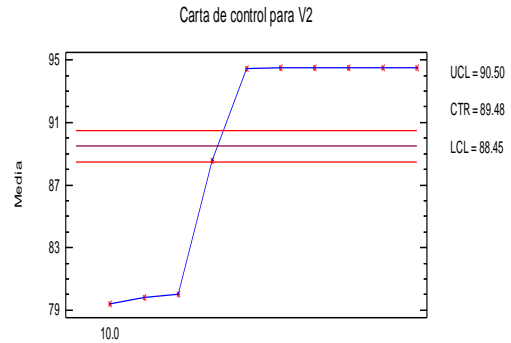
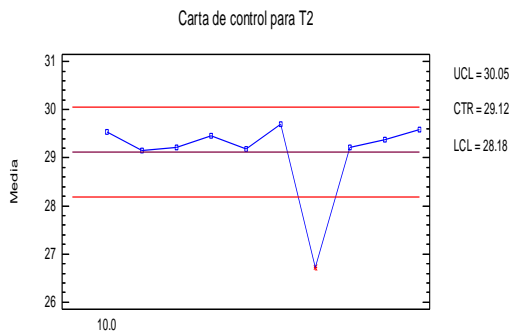


## Anexo 6. Carta de control para las variables operacionales.

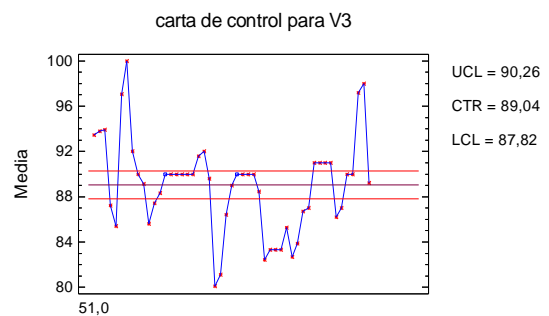
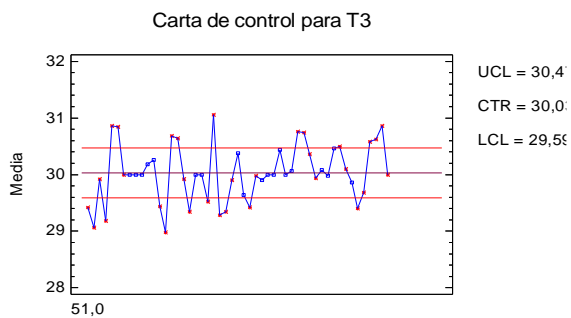
### - Carta de control para el fermentador 1.



### - Carta de control para el fermentador 2

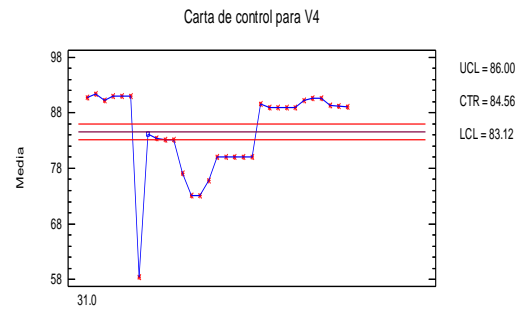
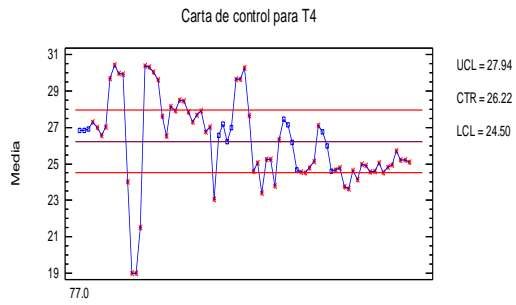


### - Carta de control para el fermentador 3.

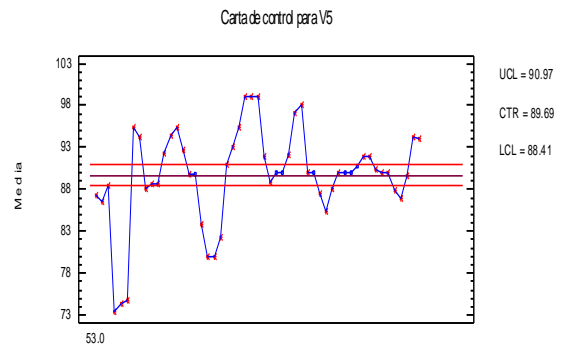
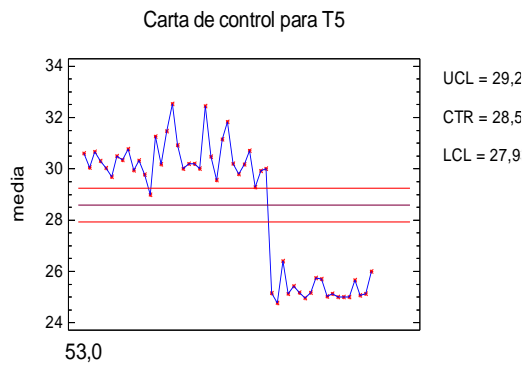




## - Carta de control para el fermentador 4



## - Carta de control para el fermentador 5.



**Anexo 7 Resultados del procedimiento para determinar datos anormales de los parámetros del producto final.**

Concentración TS3 (conidios/ml)								
ci	ti	criterio	ci	ti	criterio	ci	ti	criterio
280000000	-0.34	normal	1200000000	0.703	normal	120000000	-0.65	normal
280000000	-0.34	normal	140000000	-0.65	normal	120000000	-0.65	normal
280000000	-0.34	normal	1100000000	0.589	normal	150000000	-0.49	normal
180000000	-0.46	normal	1500000000	1.044	normal	1000000000	0.476	normal
190000000	-0.45	normal	100000000	-0.65	normal	100000000	-0.65	normal
150000000	-0.49	normal	1000000000	-0.55	normal	180000000	-0.64	normal
250000000	-0.38	normal	120000000	-0.65	normal	100000000	-0.66	normal
3000000000	2.751	normal	1000000	-0.66	normal	2700000000	2.41	normal
2100000000	1.727	normal						

**Viabilidad TS3(%)**

vi	ti	criterio	vi	ti	criterio	vi	ti	criterio
94	-0.65409	normal	1	-59	normal	97	1.2327	normal
96	0.603774	normal	97	1.23	normal	95	-0.025	normal
95	-0.02516	normal	95	-0	normal	95	-0.025	normal
97	1.232704	normal	94	-0.7	normal	90	-3.17	normal
96	0.603774	normal	96	0.6	normal	97	1.2327	normal
97	1.232704	normal	94	-0.7	normal	93	-1.283	normal
95	-0.02516	normal	94	-0.7	normal	94	-0.654	normal
94	-0.65409	normal	95	-0	normal	96	0.6038	normal
96	0.603774	normal						

### Concentración Bt (conidios/ml)

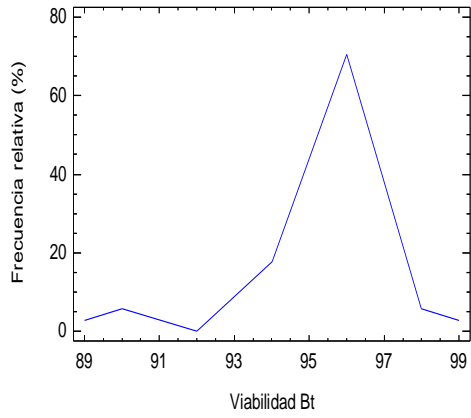
ci	ti	criterio	ci	ti	criterio	ci	ti	criterio
			110000000			500000000	2.05	
290000000	-0.834	normal	0	-0.34	normal	0	5	normal
650000000	-0.613	normal	150000000	-0.92	normal	200000000	-0.89	normal
120000000						350000000	1.13	
0	-0.276	normal	100000000	-0.95	normal	0	5	normal
300000000	0.828							
0	2	normal	450000000	-0.74	normal	120000000	-0.94	normal
100000000			350000000	1.13		130000000		
0	-0.399	normal	0	5	normal	0	-0.21	normal
200000000	0.214		450000000	1.74				
0	7	normal	0	8	normal			

### Viabilidad Bt(%)

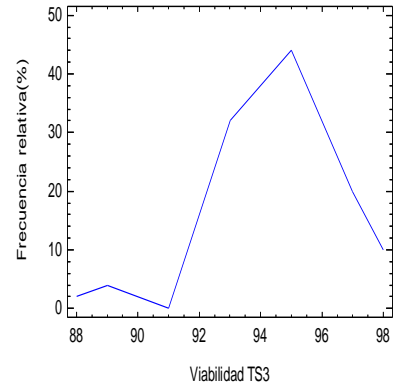
vi	ti	criterio	vi	ti	criterio	vi	ti	criterio
96	0	normal	90	-3.261	normal	97	0.54348	normal
95	-0.5435	normal	97	0.5435	normal	96	0	normal
97	0.54348	normal	97	0.5435	normal	97	0.54348	normal
96	0	normal	98	1.087	normal	96	0	normal
95	-0.5435	normal	97	0.5435	normal	97	0.54348	normal
94	-1.087	normal	97	0.5435	normal			

## Anexo 8. Histograma para los parámetros de calidad.

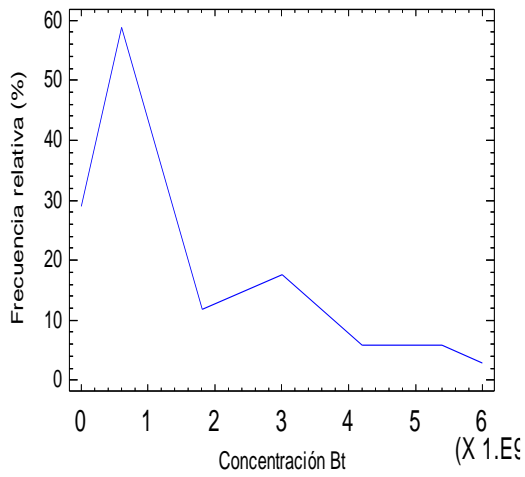
Histograma de frecuencia relativa para Bt



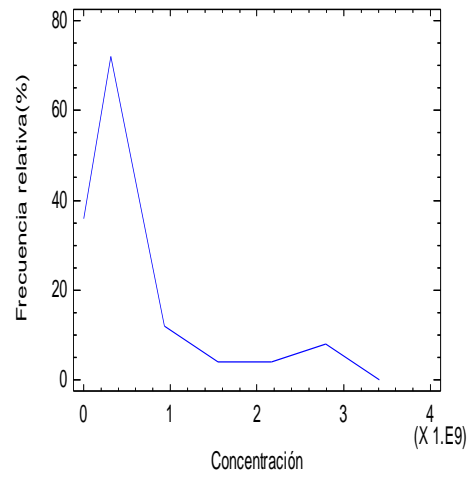
Histograma de frecuencia relativa para TS3



Histograma de frecuencia relativa para Bt



Histograma de frecuencia relativa para TS3

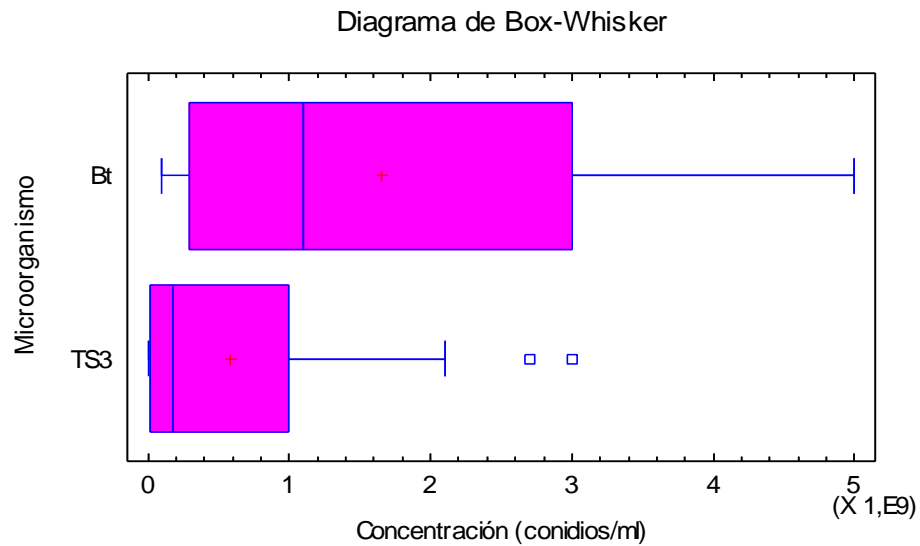


## Anexo 9. Análisis de varianza de los parámetros de calidad.

### Anexo 9.1. Análisis de varianza para concentración

#### Tabla ANOVA

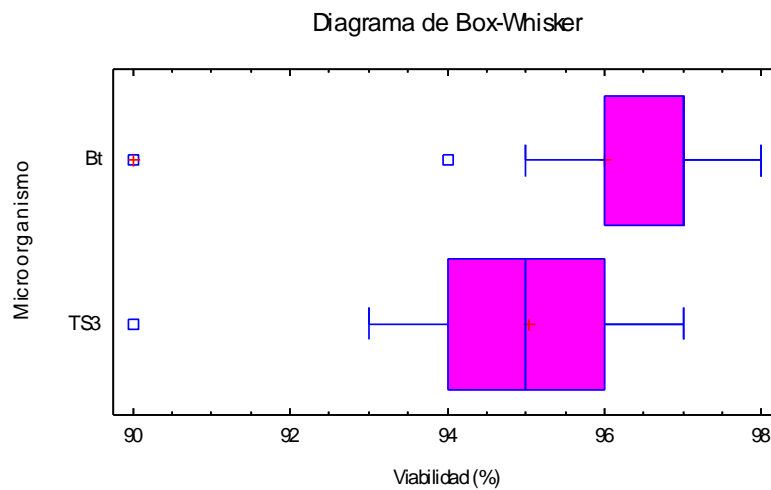
Fuente	SC	GL	CM	F <sub>calculada</sub>	P-Value
Entre grupos	1,15E19	1	1,15E19	7,56	0,0089
Dentro de grupos	6,11E19	40	1,53E18		
Total (Corr.)	7,27E19	41			



## Anexo 9.2 Análisis de varianza para viabilidad

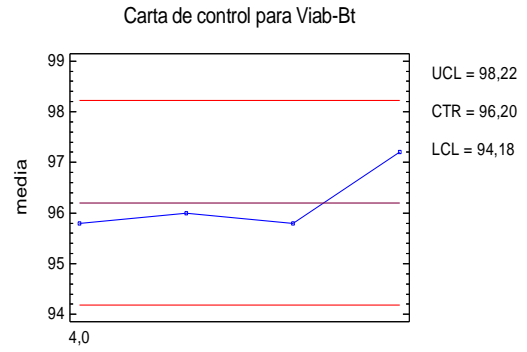
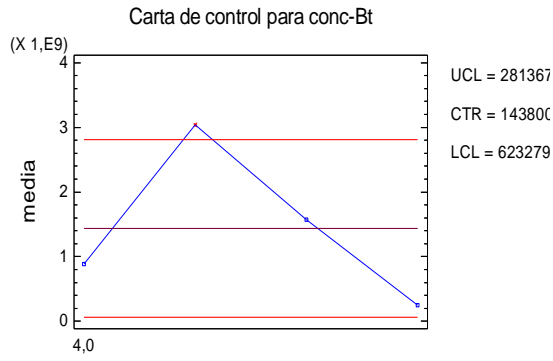
### Tabla ANOVA

Fuente	SC	GL	CM	F <sub>calculada</sub>	P-Value
Entre grupos	9,32	1	9,32	3,24	0,0792
Dentro de grupos	114,96	40	2,87		
Total (Corr.)	124,28	41			

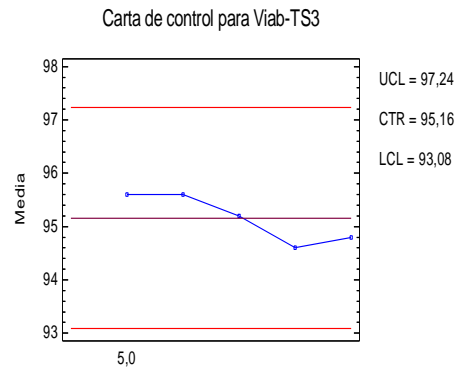
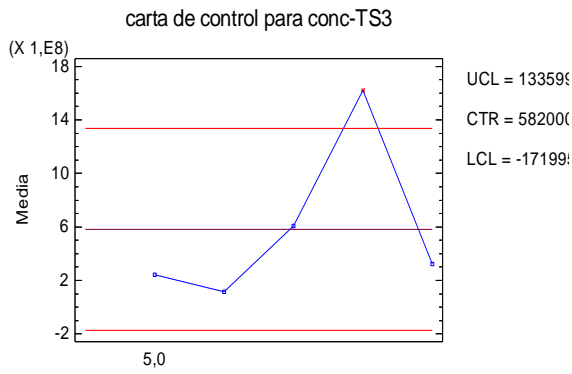


## Anexo 10. Carta de control para los parámetros de calidad.

### Carta de control para la concentración y viabilidad Bt.



### Carta de control para la concentración y viabilidad TS3.



## **Anexo 11. Simbología**

$\bar{X}$ : media

N: tamaño de muestra

S: desviación Estándar

$S^2$ : varianza

CS: coeficiente de skewness

CK: coeficiente de kurtosis

CV: coeficiente de variación

$\mu$ : media poblacional

SC: suma de cuadrada

CM: cuadrada media

GL: grado de libertad

UCL: límite superior en carta de control

CTR: valor central en la carta de control

LCL: límite inferior en carta de control

$X_i$ : valor de la variable en cada iteración