

Universidad de Matanzas
Facultad de Ciencias Técnicas
Departamento de Química



Trabajo de diploma presentado en opción al título de Ingeniero Químico

**Título: Análisis de la calidad del inóculo y del producto Thurisave-24 en la
empresa LABIOFAM Matanzas**

Autor: Xavier Jiménez Ventosa

Tutor: MSc. Irina Pedroso Rodríguez

Matanzas, Cuba

2021

DECLARACIÓN DE AUTORIDAD

Yo, Xavier Jiménez Ventosa, me declaro como único autor de este trabajo realizado en la Universidad de Matanzas, como requisito parcial para optar por el título de Ingeniero Químico y autorizo que el mismo sea utilizado por la mencionada Institución como material de consulta. Para que así conste, firmo:

Xavier Jiménez Ventosa.

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente del tribunal:

Firma:

Miembro del tribunal:

Firma:

Miembro del tribunal:

Firma:

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, María de los Ángeles, por su apoyo incondicional y los sacrificios hechos para poder lograr esta meta.

A mis amigos, Roxana, Delvis, Maité, Lianys, Rotceh y Rachel por estar ahí para mí en todo momento durante estos años de estudio.

A mi tutora, la profe Irina, por todo el apoyo brindado; sin ella no hubiera sido posible la realización de este proyecto de tesis.

A todos los profesores del departamento de Ingeniería Química por toda la dedicación y contribución en mi formación profesional

A todo aquel que de una forma u otra me brindó su apoyo durante este proceso...

¡Muchas Gracias!

RESUMEN

La investigación se realiza en la UEB Planta de Bioplaguicidas de Matanzas (LABIOFAM), con el objetivo de analizar la calidad del producto *Thurisave-24*. Para ello se aplican las siguientes herramientas estadísticas: caracterización estadística, pruebas de normalidad, pruebas de hipótesis y cartas de control y se determinan los coeficientes de capacidad. Se obtiene que el inóculo *Bacillus Thuringiensis* no cumple con las especificaciones requeridas en cuanto al pH y la concentración y los coeficientes de capacidad son inferiores a 1, indicando que debe realizarse un tratamiento serio del mismo. El producto final sólo cumple con las especificaciones de calidad en cuanto a la viabilidad, aunque muestra gran dispersión debido a ser una propiedad con una escala de medida amplia y los coeficientes de capacidad son superiores a 1, por lo que el producto está bajo control.

ABSTRACT

The research is carried out at the UEB Matanzas Biopesticide Plant (LABIOFAM), with the aim of analyzing the quality of the *Thurisave-24* product. For this, the following statistical tools are applied: statistical characterization, normality tests, hypothesis tests and control charts and the capacity coefficients are determined. It is obtained that the *Bacillus Thuringiensis* inoculum does not meet the required specifications regarding pH and concentration and the capacity coefficients are less than 1, indicating that it must be treated seriously. The final product only meets the quality specifications in terms of viability, although it shows great dispersion due to being a property with a wide measurement scale and the capacity coefficients are greater than 1, so the product is under control.

ÍNDICE

Introducción	1
Capítulo 1. Fundamentación teórica	3
1.1 Bioplaguicidas. Definición, clasificación y usos	3
1.1.1 Clasificación y usos de los bioplaguicidas	4
1.1.2 Ventajas y desventajas de los bioplaguicidas.....	7
1.2 Tipos de bioplaguicidas.....	8
1.3 <i>Thurisave-24</i> . Características y usos	12
1.3.1 Descripción del producto	13
1.3.2 Contenido del producto	13
1.4 Análisis de calidad	14
1.5 Conclusiones parciales del capítulo	18
Capítulo 2. Materiales y métodos	19
2.1 Descripción del proceso de obtención de <i>Thurisave-24</i>	19
2.2 Técnicas en el Laboratorio	24
2.3 Técnicas estadísticas para el control de calidad	25
Capítulo 3 Resultados y discusión	30
3.1 Análisis de la calidad de la materia prima (inóculo)	30
3.2 Análisis de la calidad del producto	33
3.3. Conclusiones parciales del capítulo	37
Conclusiones	38
Recomendaciones	39
Bibliografía	40

INTRODUCCIÓN

La *Bacillus Thuringiensis* fue descubierta en 1902 por el biólogo japonés Shigetane Ishiwatari. En 1911, la bacteria fue redescubierta en Alemania por Ernst Berliner, quien la aisló como causante de una enfermedad que contraían las orugas de polilla gris de la harina (llamada "Schalffsucht"). Es una bacteria Gram positiva que habita en el suelo, y que se utiliza comúnmente como una alternativa biológica al pesticida. Al igual que otros miembros del género, esta bacteria es aerobia capaz de producir endosporas. En la esporulación, forma cristales de δ -endotoxinas proteínicas de acción insecticida (llamados cristales de proteína o proteínas Cry), que son codificados por los genes Cry. Se le puede extraer la toxina Cry y utilizarla como plaguicida; por esta razón se ha empleado la Bt como insecticida. Sin embargo, existen cepas de Bt que producen cristal que no tiene acción insecticida. La misma también aparece de manera natural en el intestino de las orugas de diferentes tipos de polillas y de mariposas, así como en las superficies poco iluminadas de las plantas. Su principal uso es que actúa como una importante reserva de toxinas Cry para la producción de insecticidas biológicos.

A partir de 1985 se comenzaron los trabajos de investigación y desarrollo para tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis* por vía fermentativa en el Instituto de Sanidad Vegetal (INISAV). En 1992, una vez aprobado el Programa Nacional de Lucha Biológica entra en funcionamiento la primera Planta de Bioplaguicidas de Güira de Melena, donde se obtuvieron las primeras líneas de *Thurisave*. Posteriormente se iniciaron las producciones en las Plantas de Sancti Spiritus, Güines y Matanzas (2005). Por su disposición ministerial en el año 2012 el Grupo Empresarial LABIOFAM pasa a ser el productor y comercializador de este bioplaguicida, al asumir la dirección y administración de dichas plantas. El *Thurisave-24* se presenta como una suspensión acuosa, de color beige y se obtiene a partir de la bacteria *Bacillus Thuringiensis* Var. *Kurstaki* cepa *LBT 24*. Se utiliza como insecticida, altamente efectivo en el control de larvas de lepidópteros defoliadores tales como: *Plutellaxylostella*, *Trichoplusia ni*, *Mocislatipes*, *Spodopteraspp.*, *Heliothis virescens* en cultivos tales como: col, berro, pastos, yuca, boniato, papa, tabaco y maíz. Como modo de acción, por ingestión

provocando mortalidad en las larvas de insectos tratados. Resulta más eficaz en las primeras fases laurales cuando la plaga es más voraz y se alimenta más activamente del follaje de las plantas. Existen varias variantes como medios de cultivos para la obtención y proceso de producción a escala industrial, la Planta de Bioplaguicidas de Matanzas utiliza la Variante-1A.

Con la aprobación del Programa Nacional de Lucha Biológica, se desea crear una conciencia a la población y principalmente a los agricultores que este producto puede ser tan efectivo como los productos químicos. No producen residuos peligrosos, reduce significativamente el impacto sobre las especies que nos son objeto de los tratamientos, cuando son producidos localmente pueden ser más económicos que los insecticidas químicos y a largo plazo también pueden ser más efectivos que los pesticidas sintéticos. Por ser un producto de elevado impacto en la agricultura, la empresa periódicamente debe realizar estudios de calidad del proceso y del producto. Por ello, se plantea el siguiente problema de investigación:

¿El bioplaguicida *Thurisave-24* que se produce en la UEB Planta de Bioplaguicidas de Matanzas (LABIOFAM) cumple con las normas requeridas?

Se plantea la siguiente hipótesis:

Si se realiza un análisis estadístico de las principales variables de calidad del *Thurisave-24* se podrá determinar si este cumple con las normas requeridas.

Para dar solución al problema se plantea el siguiente objetivo general:

Analizar la calidad del *Thurisave-24* producido en la UEB Planta de Bioplaguicidas de Matanzas (LABIOFAM).

Para dar cumplimiento al objetivo general se trazan los siguientes objetivos específicos:

1. Describir el proceso de producción de *Thurisave-24*.
2. Caracterizar las principales variables de calidad del producto.
3. Determinar si las variables cumplen con la calidad requerida.
4. Determinar si las variables se encuentran bajo control estadístico.

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

En este capítulo se abordan temáticas relacionadas con los bioplaguicidas, su clasificación y usos. También se muestran las principales herramientas estadísticas que se aplican para el control de la calidad.

1.1. Bioplaguicidas. Definición, clasificación y usos

A partir de los años 50 el empleo de plaguicidas sintéticos para el control de plagas y malezas se generalizó en la agricultura debido a la reducción de mano de obra, su efectividad, simplicidad y rapidez de actuación. Pero con el transcurso del tiempo se han descubierto sus efectos sobre la salud humana, la fauna benéfica, los problemas que generan de contaminación ambiental y el desarrollo de resistencia en los insectos que ha reducido su eficacia. El mercado de plaguicidas sintéticos continúa creciendo, pero los consumidores son cada vez más conscientes de los daños que causan, y los Gobiernos, a través de los órganos reguladores, aprueban menos plaguicidas, o los retiran gradualmente del mercado. Además el costo de nuevos pesticidas sintéticos se sitúa en unos US\$240, mientras que el desarrollo de un nuevo biopesticida alcanza se establece en los US\$15-25 millones (Carbajal *et al.*, 2019; Zapata, 2020).

Esta situación abre oportunidades la introducción de productos desarrollados por la biotecnología en el mercado de los insumos agrícolas. Ya se nota esa tendencia en el mercado: mientras el mercado de los plaguicidas sintéticos crece anualmente un 2%, los bioplaguicidas lo están haciendo en un 10% anual. Y es un hecho que el sector agrícola necesita productos eficaces contra las plagas y la maleza, que no generen resistencias, que no desgaste los nutrientes del suelo, que no sean tóxicos para la fauna auxiliar y polinizadores, que no dejen residuos en los productos agroalimentarios, con plazos de seguridad nulos o reducidos, y con alta persistencia (Carbajal *et al.*, 2019).

Un bioplaguicida se define como cualquier sustancia que sea derivada de materiales naturales como microorganismos, plantas y animales utilizados para el combate de plagas. Son específicos contra las plagas blanco y, generalmente, no representan

un riesgo para los trabajadores o el medio ambiente, al contrario de los plaguicidas sintéticos que se usan de manera general (Carbajal *et al.*, 2019).

1.1.1 Clasificación y usos de los bioplaguicidas

Los bioplaguicidas se clasifican en plaguicidas microbianos, que incluyen bacterias, hongos y virus, y plaguicidas bioquímicos, que incluyen hormonas, enzimas y reguladores del crecimiento de la planta (Biryolet *et al.*, 2021; Leal *et al.*, 2022)

- Plaguicidas microbianos

Los plaguicidas microbianos son derivados de las, bacterias, hongos, nematodos, protozoos, virus y otros compuestos, como los metabolitos, que se producen directamente de estos microorganismos. Cd uno de ellos puede controlar una variedad alta de plagas, aunque son relativamente específicos para las plagas blanco, por ejemplo, hay ciertos hongos que controlan malezas y otros que matan insectos. Hasta ahora se han registrado más de 3000 tipos de microorganismos que causan enfermedades en insectos. Sin embargo, se pueden hacer más investigaciones para encontrar microorganismos que sean útiles para el control de plagas (Simberloff, 2012).

Silva y Tapia (2020) mencionan que entre la variedad de ventajas del uso de plaguicidas microbianos se puede destacar que no son tóxicos ni patógenos para organismos y seres humanos; pueden se usar en combinación con algunos insecticidas químicos, disminuyendo el uso de este segundo grupo; pueden utilizarse al momento de recolección al no tener efecto adverso en los seres humanos; y en algún momento estos microorganismos pueden establecerse en el hábitat para proporcionar control de plagas a generaciones o temporadas tras estación. Consecuentemente, el uso de plaguicidas microbianos requiere de un amplio estudio científico que incluya estudios sistemáticos, modos de acción, patogenicidad, estudios ecológicos, entre otros.

- Plaguicidas bacterianos

De los distintos grupos de patógenos que existen, las bacterias son las de mayor éxito comercial. Estos microorganismos varían en el modo de infección, el sitio

donde se replican y el mecanismo patogénico. Se calcula que ocupan el 74% del mercado y su gran uso se debe a que varias especies importantes pueden crecer en medios de fermentación y no requieren de métodos caros de cultivo (Nava *et al.*, 2012; Ramakrishnan, *et al.*, 2019).

Las bacterias patogénicas se introducen en los hospederos cuando estos ingieren el alimento; una vez dentro de los insectos, las bacterias comienzan a reproducirse generando enzimas y toxinas que dañan las células del intestino facilitando la invasión del hemocele del insecto. Una vez instaladas en el organismo, continúan multiplicándose hasta matar al hospedero por acción de sus toxinas o enzimas que causan septicemia. Generalmente estos insectos que mueren por una infección bacteriana, se tornan oscuros y su cuerpo se pone flácido (Nava *et al.*, 2012).

Uno de los patógenos que ha sido explotado comercialmente es *Bacillus thuringiensis*, pero se han registrado más de 50000 serotipos, de los cuales por lo menos 65 han sido reconocidos y recibido nombre a nivel de subespecie. La mayoría de estos serotipos afectan larvas de *lepidópteras*. Los insectos que ingieren estas bacterias mueren por un efecto combinado de envenenamiento por toxinas y la multiplicación de las bacterias en el insecto. Los bioplaguicidas que contienen estos patógenos son realmente importantes en la agricultura orgánica y el manejo integrado de plagas por la compatibilidad que tienen con parasitoides y depredadores (Kumar *et al.*, 2021; Pohare *et al.*, 2021)

- Plaguicidas virales

Los virus son especialmente útiles contra plagas que presentan resistencia múltiple, atacan de manera específica a los insectos y a son controladores naturales altamente efectivos de varias plagas de orugas. La familia *Baculoviridae* es una de las más estudiadas por su capacidad entomopatógena. Los plaguicidas virales tienen que ser ingeridos por los insectos para poder causar una infección, pero también se pueden propagar de un insecto a otro durante su ciclo de reproducción o la puesta de huevecillos del insecto. Esta clase de plaguicidas son efectivos contra lepidópteros presentes en algodón, arroz y vegetales. Su uso está limitado a pequeñas áreas en la agricultura porque su producción a gran escala presenta

algunas dificultades (Wood, 2018). Se calcula que los bioplaguicidas virales ocupan el 5% del mercado (Agathos, 2018; Nava *et al.*, 2012).

Entre 2003 y 2004 en Brasil, se usó el *nucleopoliedrovirus* que infecta a la oruga de las leguminosas (*Anticarsia gemmatalis*) en cultivos de soya, considerándose una de las aplicaciones más exitosas y utilizándose en aproximadamente 2 millones de hectáreas (Gómez y Villamizar, SD. Actualmente, se comercializan más de treinta bioinsecticidas basados en *Baculoviruses* (Nava *et al.*, 2012; Wilson *et al.*, 2020).

- Micoinsecticidas

En 1888, se descubrió la capacidad del hongo *Arthrobotrys oligospora* para infectar nematodos. Actualmente, se conocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies de hongos entomopatógenos. Algunas especies de hongos entomopatógenos son reguladores importantes de poblaciones de insectos con un gran potencial como agentes micoinsecticidas contra plagas en la agricultura (Aquino, 2020). Los micoinsecticidas infectan insectos como áfidos, moscas blancas, insectos escama (*Coccoidea*), pulgones (*Aphididae*) y chinches (*Cimicidae*) (Careño, 2020; Nava *et al.*, 2012; Rodríguez *et al.*, 2020).

El mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos consiste en infectar a los huéspedes a través de la cutícula para que puedan tener acceso a la hemolinfa, donde producen toxinas y crecen utilizando los nutrientes presentes en el hemocele, evitando la respuesta inmune en los insectos. Los hongos entomopatógenos se aplican en forma de conidios o micelios para esporular después de ser aplicados. El uso de estos hongos como una alternativa a los insecticidas de origen químico podría ser muy útil para el manejo de la resistencia a los insecticidas, ya que, en comparación con los insecticidas de origen químico, los hongos entomopatógenos tienen una caída más lenta y por lo general incompleta, provocando la muerte de los insectos más allá del tiempo alcanzado por los insecticidas químicos. Los bioplaguicidas micóticos representan el 10% de las ventas en el mercado. Los hongos *Metarhiziumanisopliae*, *M. flavoviridae*, *Paecilomycesfarinosus*, *Beauveria bassiana* y *B. brongniartii* son algunos de los más utilizados (Sarwar, 2020; Sarwar, 2015).

1.1.2 Ventajas y desventajas de los bioplaguicidas

El desarrollo de los bioplaguicidas favorece la agricultura sustentable y reemplaza de manera efectiva el uso de plaguicidas químicos, pues son biodegradables, eficaces, menos costosos que los pesticidas, con poco o ningún riesgo. La mayoría de ellos son altamente específicos, por lo que sólo atacan al organismo blanco sin causar daño a otras especies y evitan la dependencia de un sólo método de control de plagas y la generación de resistencia por parte de éstas.

Sin embargo, en algunas ocasiones el uso de bioplaguicidas puede ser dañino para otros organismos no objetivo. Cuando un bioplaguicida ataca a un organismo biorregulador que forma parte importante de la cadena trófica del ecosistema, el equilibrio del agrosistema puede ser interrumpido. Este es un ejemplo de lo que puede ocurrir con el uso no controlado de los bioplaguicidas, así que para su correcto manejo se deben tener parámetros que limiten y definan su uso (Simberloff, 2012), lo cual se puede lograr realizando estudios de impacto ambiental en la zona agrícola donde se desea aplicar el bioplaguicida para evitar los posibles daños que podrían causar.

No todos los bioplaguicidas carecen de toxicidad por el hecho de tener constituyentes naturales, pues, por ejemplo, los microorganismos responsables de control biológico pueden causar un impacto negativo sobre otros organismos en el ecosistema. Además, como los efectos dañinos en la salud humana pueden tardar décadas en ser descubiertos, al igual que con los plaguicidas de síntesis, también deberíamos tener en cuenta siempre el “principio de precaución”, y limitar su aplicación (Bautista *et al.*, 2018).

Respecto a los plaguicidas de síntesis, los bioplaguicidas presentan varias ventajas para la protección de los cultivos (Almeida *et al.*, 2017; Martínez *et al.*, 2021; Otieno, 2019):

- No dejan residuos químicos en los productos agroalimentarios.
- No tienen períodos de carencia entre tratamientos, o tales períodos son muy cortos, por lo que es posible proteger los cultivos hasta el momento de la cosecha.

- Tienen menor impacto medioambiental, ya que normalmente son menos tóxicos que los pesticidas sintéticos, y generalmente sólo afectan a la especie de plaga que se desea controlar.
- En algunos países los registros de bioplaguicidas imponen menos restricciones que los pesticidas sintéticos. Lo que hace que el proceso de aprobación sea más rápido

Los principales inconvenientes son (Bautista *et al.*, 2018; Hernández *et al.*, 2019; Jimenez, 2019):

- Alta especificidad, lo cual hace necesaria una identificación exacta de la plaga o su patógeno para realizar el tratamiento adecuado.
- Dado que su tipo de acción es distinto al de los pesticidas de síntesis, es necesario utilizar mayores dosis y repetir a menudo los tratamientos. De este modo, en ciertos casos en que los daños de la plaga ya pueden ser muy elevados pueden no ser adecuados para su utilización.
- Suelen tener más un carácter preventivo que curativo, tanto porque su vida útil es más corta, por su persistencia limitada en campo, y por el tipo de acción que realiza, generalmente más lenta.
- Suelen tener una vida útil más corta.
- Algunos bioplaguicidas utilizan componentes no renovables (como jabones potásicos, metaldehído, caldo bordelés, azufre, oxiclورو de cobre, sulfato de cobre, y en ocasiones requieren un elevado proceso de transformación para su uso, por lo que no es exactamente una solución para una agricultura sostenible.

1.2 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 (Wang *et al.*, 2021).

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 (Huang *et al.*, 2020)

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 *et al.*, 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. Wang *et al.*, (2017) refieren que esta bacteria 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 *et al.*, 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 pp.*, 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 *et al.*, 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.) (Halawa *et al.*, 2019).

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 y St. Leger, 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 (Li *et al.*, 2021).

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*, *Pythiumsp* 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 (Santos *et al.*, 2008).

- *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 (Manasfi *et al.*, 2020; Miranda *et al.*, 2021). A su vez produce toxinas como *trichodermin* 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*, *Sclerotiumrolfsii*, *Pythiumsp.*, *Fusarium sp.*, *Poma sp.*, *Sclerotinia sp.*, y *Botrytissp.*, en cultivos hortícolas, tomate, lechuga, ají, papa, melón, ornamentales y otros (Cristóbal *et al.*, 2021; García y González, 2021; Varela, 2021).

- *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*, *Sclerotiumrolfsii*, *Sclerotiniaminor*, *Fusarium oxisporum* en cultivos de vegetales, granos y ornamentales. Puede aplicarse al suelo en semilleros o en campo (Georgieva *et al.*, 2021; Roupael *et al.*, 2020).

1.3 *Thurisave-24*. Características y usos

Bacillus thuringiensis (*Thurisave*) fue descubierta en 1902 por el biólogo japonés Shigetane Ishiwatari. En 1911, la bacteria fue redescubierta en Alemania por Ernst Berliner, quien la aisló como causante de una enfermedad que contraían las orugas de polilla gris de la harina (llamada “Schalffsucht”). En 1976, Robert A. Zakharyan informó de la presencia de un plásmido en una cepa de *B. thuringiensis* y sugirió que éste participaba en la formación de endosporas y de cristales (Chenget *al.*, 1999).

A partir de 1985 se comenzaron los trabajos de investigación y desarrollo para tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis* por vía fermentativa en el Instituto de Investigación de Sanidad Vegetal (INISAV). En 1992, una vez aprobado el Programa Nacional de Lucha Biológica entra en funcionamiento la primera Planta de Bioplaguicidas de Güira de Melena, donde se obtuvieron las primeras líneas de *THURISAVE*. Posteriormente se iniciaron las producciones en las Plantas de Sancti Spíritus, Güines y Matanzas. Por disposición ministerial en el año 2012 el Grupo

Empresarial LABIOFAM pasa a ser el productor y comercializador de este bioplaguicida, al asumir la dirección y administración de dichas plantas.

1.3.1 Descripción del producto

Se presenta como una suspensión acuosa o suspensión concentrada, de color crema a carmelita claro. Obtenida a partir de la bacteria *Bacillus Thuringiensis* var. *Kurstaki* serotipo H-3 cepa LBT 24 (Reinaldo, 2020).

Se utiliza como insecticida para el control de larvas de lepidópteros defoliadores tales como: *Spodoptera spp.*, *Plutellaxyllostella*, *Trichoplusia ni*, *Mocislatipes*, *Erinnys ello*, y *Heliothis virescens* en los cultivos de maíz, col, berro, pastos, yuca, boniato, papa, tabaco y otros (Márquez *et al.*, 2019).

1.3.2 Contenido del producto

Suspensión acuosa:

Ingrediente activo: Esporas y cristales endotóxicos de *Bacillus thuringiensis*

Concentración: 1 - 3 x 10⁹ esporas/mL

Concentración Unidades Infecciosas: 8,000-10,000

Ingrediente inerte: Sulfato Doble Aluminio y Potasio (Alumbre) 5 g/L (0.5 %)

Preservo: ácido sórbico 1 g/L (0.1 %).

Suspensión Concentrada:

Ingrediente activo: Esporas y cristales endotóxicos de *Bacillus thuringiensis*

Concentración: 3 - 6 x 10⁹ esporas/mL.

Concentración Unidades Infecciosas: 18,000-22,000

Ingrediente inerte: Sulfato Doble Aluminio y Potasio (Alumbre) 5 g/L y 0.5 %

Preservo: ácido sórbico 1 g/L y 0.1 %

1.4 Análisis de calidad

Definir la calidad no es una tarea fácil; una de las definiciones más unánimemente admitidas se debe a Juran (1995), citada por Huerga y Abad (2004), quien la define

como “adecuación al uso”, aunque el propio Juran matiza que la adecuación al uso se desdobra en dos partes: mayor calidad implica satisfacer las necesidades del consumidor, y mayor calidad implica ausencia de deficiencias (Fernández, 2017)

Frías *et al.*, (2012) definen la calidad la adecuación de un producto o servicio para ser usado y distinguen dos tipos de calidad:

- Calidad de diseño: nivel de calidad elegido en la fase de diseño del - producto o servicio.
- Calidad de conformidad: grado de adecuación a las especificaciones y tolerancias del diseño que se consigue en la fase de fabricación del producto.

Se denominan características de la calidad a los rasgos o propiedades que definen la calidad de un producto o servicio (longitud, resistencia, color, fiabilidad).

La concepción de la calidad ha evolucionado y ha atravesado distintas etapas, describiendo las mismas en la Tabla 1.1, enfatizando en el concepto y objetivo.

Actualmente, se está imponiendo la filosofía de que la calidad se gestiona de la misma manera que cualquier otra actividad empresarial. Esta gestión de la calidad, exige un plan estructurado de acciones: la planificación, el control y la mejora, procedimientos que constituyen lo que se ha dado en llamar “la trilogía de Juran”, y que establecen un marco de referencia especialmente útil para lograr los objetivos de calidad.

En la fase de planificación se diseña, no sólo el producto o servicio, sino también el proceso capaz de conseguir ese producto. La planificación es clave en la consecución de objetivos de calidad, es la etapa donde se identifican los clientes y sus necesidades, y entendiendo la calidad como la satisfacción del cliente, es claro que una correcta planificación es el punto de partida para crear calidad.

Huerga y Abad (2004) plantean que después de planificar es necesario controlar, es decir comprobar y vigilar que se están cumpliendo los objetivos de calidad fijados y, si es necesario, actuar sobre la diferencia.

Tabla 1.1 Evolución de la calidad. (Fuente: García, 2007)

Etapa	Concepto	Finalidad
Artesanal	Hacer las cosas bien independientemente del costo o esfuerzo para ello	<ul style="list-style-type: none"> - Satisfacer al cliente. - Satisfacer al artesano, por el trabajo bien hecho. - Crear un producto único.
Revolución Industrial	Hacer muchas cosas no importando que sean de calidad, (Se identifica producción con calidad)	<ul style="list-style-type: none"> - Satisfacer una gran demanda de bienes. - Obtener beneficios.
Segunda Guerra Mundial	Asegurar la eficiencia del armamento sin importar el costo, con la mayor y más rápida producción (Eficacia + Plazo = Calidad)	Garantizar la disponibilidad de un armamento eficaz en la cantidad y en el momento preciso.
Posguerra (Japón)	Hacer las cosas bien a la primera	<ul style="list-style-type: none"> - Minimizar costos mediante la calidad. - Satisfacer al cliente. - Ser competitivo.
Posguerra (Resto del mundo)	Producir, cuanto más mejor	Satisfacer la gran demanda de bienes causada de la guerra
Control de calidad	Técnicas de inspección en Producción para evitar la salida de bienes defectuosos.	Satisfacer las necesidades técnicas del producto.
Aseguramiento de la calidad	Sistemas y procedimiento de la organización para evitar que se produzcan bienes defectuosos.	<ul style="list-style-type: none"> - Satisfacer al cliente. - Prevenir errores. - Reducir costos. - Ser competitivo.
Calidad total	Teoría de la administración empresarial centrada en la permanente satisfacción de las expectativas del cliente,	<ul style="list-style-type: none"> - Satisfacer tanto al cliente externo como interno. - Ser altamente competitivo. - Mejora continua

Tradicionalmente, el control, se dirigía a cuestiones puramente técnicas, como las características de los productos (peso, tamaño, espesor, diámetro), o las condiciones bajo las cuales funciona un proceso (temperatura, tiempo utilizado); sin

embargo, en la actualidad su alcance es mucho más amplio y se extiende al control de los resultados de cualquier organización (costes, plazos de entrega, etc.).

Por último, está la mejora, que para que sea efectiva debería ser continua. Siempre habrá algo que corregir; en realidad, la idea que subyace cuando se habla de mejora de la calidad, es que un producto nunca es lo suficientemente bueno y que se debe mejorar continuamente. Cuando una organización empresarial es consciente de la necesidad de mejorar, habrá dado un importante paso adelante.

El “Control Estadístico de Procesos” (CEP) nació a finales de los años 20 en los Bell Laboratories. Su creador fue W. A. Shewhart, quien en su libro “Economic Control of Quality of Manufactured Products” (1931) marcó la pauta que seguirían otros discípulos distinguidos (Joseph Juran, W.E. Deming, etc.).

Antes de adentrarnos en el control estadístico de procesos es importante tener en cuenta 3 conceptos básicos:

- Estadística: Este término implica recolección, representación e interpretación de datos y particularmente proporciona conclusiones gráficas obtenidas a partir de información numérica.
- Control: En este caso, control significa mantener el proceso dentro de los límites, o hacer que este se comporte de la manera que se espera. El Control por sí mismo no es suficiente, ya que después de lograrlo se debe continuar con un proceso de mejoramiento.
- Proceso: Cualquier actividad puede ser un proceso. Una definición más precisa considera un proceso como la combinación de métodos, personas, materiales condiciones ambientales y equipo requeridos para obtener el resultado deseado.

Diferentes investigadores han definido el Control Estadístico de Procesos, en todos los casos se plantea que el mismo se basa en herramientas estadísticas.

El Control Estadístico de Procesos (CEP) también conocido por sus siglas en inglés SPC (*Statistical Process Control*), es un instrumento de gestión que, comparando el funcionamiento del proceso con unos límites establecidos estadísticamente, permite

implantar y garantizar los objetivos deseados bajo la filosofía de la prevención. A la vez, permite conseguir, mantener y mejorar procesos estables y capaces.

Martínez (2010) define el Control Estadístico de la Calidad como la aplicación de diferentes técnicas estadísticas a procesos industriales (mano de obra, materias primas medidas, máquinas y medio ambiente), procesos administrativos y/o servicios con objeto de verificar si todas y cada una de las partes del proceso y servicio cumplen con unas ciertas exigencias de calidad y ayudar a cumplirlas, entendiendo por calidad “la aptitud del producto y/o servicio para su uso.

Para Montgomery (2014) el CEP es una herramienta estadística de la calidad que permite conocer, por medio de la comparación continua, los resultados y la calidad de un proceso de fabricación, identificando a través de datos estadísticos las tendencias y variaciones más significativas con el fin de prevenirlas, controlarlas y eliminarlas. Sirve, además, como herramienta para distinguir entre las causas comunes y especiales de variación, para conocer los efectos de cambios o variaciones introducidas al proceso, y para tomar decisiones de cuando se debe ajustar un proceso.

Refiriéndose a los procesos de producción Díaz y Ruiz (2009) define que el Control Estadístico de Procesos (CEP) permite monitorear el proceso de producción, mediante datos reales y confiables. Esta información se agrupa bajo conceptos estadísticos y se dispone de forma tal que permita la detección y el análisis de errores, reproceso y sobre costos de producción, y así tomar medidas correctivas en el proceso, antes de iniciar uno nuevo. Todo esto se consigue a través de un conjunto de herramientas estadísticas que permiten recopilar, estudiar y analizar la información de procesos repetitivos para poder tomar decisiones encaminadas a la mejora de los mismos.

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. (Montoya, 2017).

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. (Montoya, 2017).

1.5 Conclusiones parciales del capítulo

- Los bioplaguicidas se clasifican en plaguicidas microbianos, que incluyen bacterias, hongos y virus, y plaguicidas bioquímicos, que incluyen hormonas, enzimas y reguladores del crecimiento de la planta.
- Los bioplaguicidas más utilizados son: *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Bacillus subtilis* y *Trichoderma spp.*
- El *Thurisave-24* se utiliza como insecticida para el control de larvas de lepidópteros defoliadores tales como: *Spodoptera spp.*, *Plutella xylostella*, *Trichoplusia ni*, *Mocis latipes*, *Erinnys ello*, y *Heliothis virescens* en los cultivos de maíz, col, berro, pastos, yuca, boniato, papa, tabaco y otros.
- El uso de herramientas estadísticas permite el control de la calidad de productos y en el proceso.

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describe el proceso tecnológico para la obtención de *Thurisave-24*. Además, se muestran las técnicas empleadas para el análisis de la calidad del inóculo y del producto final.

2.1 Descripción del proceso de obtención de *Thurisave-24*

Para el proceso de fermentación de la *Bacillus Thuringiensis* existe un procedimiento general que no es más que la suma de diferentes sub-procedimientos por etapas del mismo, los cuales serían:

- 1 Preparación de la materia prima.
- 2 Esterilización.
- 3 Inoculación.
- 4 Toma de muestras.
- 5 Fermentación.
- 6 Envase.
- 7 Almacenamiento y conservación.

El Anexo 1 muestra el diagrama de flujo del proceso.

1. Preparación de la materia prima

Se procede al pesaje de la materia prima acorde con la Variante-1 del medio de cultivo a utilizar en el proceso de fermentación de la *Bacillus thuringiensis* (*Thurisave-24*). La misma se disuelve en agua y se vierte en el interior del fermentador y luego se enrasa según la cantidad de litros de agua suave a utilizar.
Esterilización.

- Antes de esterilizar se ajusta el pH del medio de cultivo, el cual se verificará durante todo el proceso. En caso necesario ajuste el valor entre 5,5-7,5 con solución de HCl (concentrado) o NaOH al 40 %.
- Se cierran todas las válvulas del fermentador excepto la salida del aire del mismo, se regula la velocidad de agitación a 90 rpm.

- Se fija la temperatura deseada en el controlador automático (121 °C).
- Se abre la válvula de drenaje de la chaqueta.
- Se abre la válvula de entrada de vapor a la chaqueta.
- Se regula la válvula de drenaje de la chaqueta, de forma tal que permita la salida de los condensados de vapor.
- Se abre la válvula de drenaje del filtro de entrada de aire.
- Se abre la válvula de vapor al filtro de aire para esterilizarlo, hay que poner cuidado en mantener la presión por debajo de 0,1 MPa para que no se dañen los cartuchos filtrantes, se deja pasar vapor a través del filtro durante 15 min.
- Cuando la temperatura del equipo llegue a 90 °C se abre la válvula de vapor que esteriliza la línea de entrada de aire al medio de cultivo, simultáneamente se regulan las válvulas de salida del fermentador permitiendo que los vapores originados dentro del mismo pasen a través del filtro de salida esterilizándolo durante 15 minutos. También se hace circular estos vapores a través de las líneas de agregación de aceite y otros productos auxiliares del proceso.
- Se abre la válvula de vapor, así como la salida del mismo dejando pasar vapor durante 30 minutos.
- Se cierra la válvula de salida de la toma muestras.
- Se abre la válvula del fermentador a la toma muestras permitiendo que circule el vapor hacia dentro del equipo ayudando al aumento rápido de la temperatura.
- Se cierran todas las válvulas de salida del fermentador provocándose un aumento rápido de la temperatura y la presión hasta 121 °C y 0,15 MPa respectivamente, lográndose así la temperatura de esterilización.
- Se cierran todas las válvulas de entrada y salida del fermentador permitiendo que se mantenga esta temperatura durante 1 hora, el tiempo necesario para lograr la esterilización del medio de cultivo.

- Transcurrido este tiempo se procede a disminuir la temperatura hasta la temperatura de fermentación (30 °C).
- Este paso se realiza utilizando primeramente agua suave de temperatura ambiente, con la cual se enfría aproximadamente hasta los 50 °C, esta se logra abriendo la válvula de agua suave a la chaqueta, así como la válvula de salida de esta. Al disminuir la temperatura disminuye con ella la presión por lo que hay que mantener la misma por encima de 0,05 MPa, lo cual se logra pasando aire al interior del fermentador hasta que abren las válvulas de entrada y salida de aire estableciendo el flujo del mismo y con esto la oxigenación del medio de cultivo.
- Cuando la temperatura llega a 50 °C se continúa el enfriamiento con agua fría de 12 °C, la cual se logra abriendo las válvulas de entrada y salida de agua fría a la chaqueta, la cual retornara nuevamente a la cisterna para volver a enfriarse. Este paso permite enfriar hasta la temperatura de trabajo o fermentación.

2. Inoculación.

- Antes de inocular se toma una muestra para comprobar la eficiencia de la esterilización. Se recoge una muestra (muestra 0) de 150 mL en un erlenmeyer estéril de 500 mL y se coloca en la zaranda a 140 rpm, 30 °C. Observe la muestra 0 al final de la fermentación, mediante el microscopio, de una tinción de Gram para determinar la presencia de contaminantes y ver si cumple con los requisitos de calidad (esterilidad).
- Se ajusta el valor de pH si no estuviera entre 5,5-7,5 con solución de HCl (concentrado) o NaOH al 40 %.
- Para inocular se deben extremar las normas de control biológico, por lo que el personal que interviene en esta acción debe hacerlo usando los medios de protección indicados. Como guantes, mascarillas, botas de gomas, uniforme sanitario, etc. Durante la inoculación no se permite conversar.

- Se procede a la inoculación en condiciones estériles, en el caso de partir de un pre-fermentador se utilizan mangueras estériles directamente al fermentador, hasta pasar la cantidad de inóculo necesaria, para obtener la concentración inicial establecida de $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ esporas/mL. Si parte de inóculos obtenidos en zaranda o frascos Roux, prepare en inoculador esterilizando previamente a 121 °C durante 30 minutos en autoclave. Durante el proceso de inoculación al fermentador, se procede con las medidas de asepsia establecidas mediante el uso de mechero y sustancias desinfectantes (alcohol).
- Se regula la presión del fermentador a 0,005 MPa.
- Se enciende el anillo de protección de fuego y se pone en la parte de inocular, retirándose la tapa de dicho se vierte de inmediato el líquido semental. Se pone la tapa y se aprieta bien.
- Se retira el anillo de protección de fuego.
- Se regula la presión de aire al fermentador al valor indicado de tecnología 0,04-0,06 MPa durante todo el proceso.

En esta etapa del proceso se mide las principales variables las cuales son: concentración y pH las cuales tienen que estar bajo la norma requerida.

3. Toma de muestras.

- La toma de muestras se realiza extremando las medidas de seguridad biológica, el personal que participa, usará los medios de protección establecidos para ello.
- Se esterilizará durante 30 minutos la línea y él toma muestras. Se hace abriendo la válvula de vapor y la salida de la toma muestras para que el vapor circule durante el tiempo indicado, posteriormente se cierra la válvula del vapor y se abre la válvula de salida de líquido del fermentador.
- Se deja correr una porción de líquido y luego se destapa el recipiente donde se verterá la muestra, después de tomada la misma se tapa el recipiente, todo eso bajo flameo de llama protectora.

- Se toma una muestra de 150 mL bajo condiciones estériles, en un erlenmeyer de 500 mL previamente esterilizado, 30 minutos después de inocular (muestra paralela).
- Se cierra la válvula de salida del fermentador y se abre de nuevo la de vapor para esterilizar él toma muestras del resto de producto que pueda quedar.
- Coloque la muestra en la zaranda orbital a 140 rpm, 30 °C hasta el final de la fermentación para corroborar los resultados obtenidos durante el proceso fermentativo. Se realiza control de pureza mediante tinción de Gram y siembra en medios específicos de pureza.
- Tome muestras durante el proceso cada 8 horas hasta las 24 horas y después cada 2 horas hasta el final del proceso.
- Determine para cada muestra las características microbiológicas del cultivo, valor del pH y su pureza mediante tinción de Gram y tinción con violeta cristal para definir las características del cultivo.
- Realice al final del proceso el conteo de células totales en Cámara de Neubauer en el microscopio.

4. Fermentación.

Este proceso se lleva a cabo haciendo circular aire a través del líquido inoculado, durante el tiempo establecido para el crecimiento del microorganismo en cuestión manteniéndose las condiciones necesarias según se requieran.

Condiciones requeridas:

- ~ pH
- ~ Temperatura
- ~ Agitación
- ~ Presión
- ~ Flujo de aire
- ~ Se deja fermentar durante el tiempo que requiera para el crecimiento

- ~ Se toman muestras periódicamente, se chequean y se registran todos los parámetros mencionados lo cual permiten evaluar la marcha del proceso y el momento adecuado para su terminación.
- Disminuya si es necesario después de las 24 horas, y finalizando el proceso la aireación para acelerar la lisis del esporangio y liberación de las esporas.
- Circule agua fría por la chaqueta del fermentador hasta 15 °C durante 15-20 minutos para favorecer la lisis del esporangio y la liberación de esporas.
- El proceso de fermentación dura de 24-28 horas y se debe alcanzar un título entre $1-3 \times 10^9$ esporas y cristales/mL correspondiente con un 95 % de cristales aproximadamente. El pH en este momento está entre 7,2-7,5.
- Se le añade el preservante, Ácido Sórbico 1 g/L y se mantiene la agitación por 30 minutos.

Después de cada proceso de fermentación se esteriliza el fermentador con Hidróxido de sodio (5 kg) aumentando la temperatura hasta 60 °C por 3 horas, Cloro, Ácido fosfórico (5 L), Cloruro de Benzalconio, Detergente, etc.

5. Envase.

- El envase se realiza directamente del fermentador hacia los frascos plásticos de 20 L, los cuales serán previamente esterilizados durante 15 minutos mediante una línea de vapor procedente del fermentador.
- Se mantiene la agitación del fermentador durante el proceso de llenado para garantizar la homogeneidad del producto.

6. Almacenamiento y conservación.

- Almacénese bajo techo y en lugar fresco a temperatura entre 25-28 °C o en refrigeración 4-6 °C durante 6 meses.

2.2 Técnicas en el Laboratorio

Se prepara el medio con Caldo Nutriente (Peptona bacteriológica-5,0 g/L, Extracto nutritivo-1,0 g/L, Extracto de Levadura-2,0 g/L, Cloruro de Sodio-5,0 g/L) 13 g x 1 L de agua destilada; medio general para cultivo de microorganismos menos eficientes

y Agar Nutriente (Pérdida por desecación más o menos 12 g), empleado como agente gelificante para la preparación de medios de cultivo.

Para 2 L de mezcla se preparan 20 pomos de 50 mL. La mezcla se esteriliza en una autoclave a presión de vapor unos 45 minutos, luego se echa en los pomos y se vuelve a esterilizar otros 45 minutos y se ponen acostado a formar una cuña a enfriar. Cuando la cuña esta fría y dura, se siembra la cepa del tubo enviado por Sanidad Vegetal, auxiliándose de un haza y esparciéndola a todo lo largo de la cuña. Se espera el tiempo establecido de cosecha (5 días).

Se prepara una solución de 1-2 L de agua destilada con sal común (10 g/L) y se esteriliza, se espera a que enfríe. Luego se cogen los pomos sembrados del microorganismo (*Bacillus thuringiensis*) y se llenan aproximadamente 2 cm de esa agua con sal; con el haza se raspa la capa crecida y se vuelve a echar esa agua en el recipiente previamente esterilizado.

Se le hace una tinción de Gram a esa agua salada ya inoculada con la cepa, se analiza en el microscopio para analizar si hay contaminantes y luego dependiendo de su estado se pasa al proceso de fermentación.

Se hace un análisis para determinar el control de la calidad del inóculo (Pruebas de concentración, Viabilidad, Pureza, etc.)

- Concentración: Se cogen varias réplicas de concentración hasta 10 mL (10^4 , 10^6 , 10^8 , 10^9) y se va analizando, debe estar en un rango de $1-3 \times 10^9$ conidios/mL e igual la Viabilidad.
- Pureza menor o igual 10^5 UFC/mL.
- pH: 6-7.

2.3 Técnicas estadísticas para el control de calidad

Se analizan el inóculo y el producto final (PF), en la tabla 2.1 se muestran las variables estudiadas. Se toman 15 muestras, con cuatro réplicas cada una en el mes de septiembre del 2021 (Anexo 2).

Tabla 2.1 Variables a estudiar

Variable	Unidad	Norma
pH del inóculo		6,8 – 7,0
Concentración del inóculo	esp/mL	$5 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$
pH del producto final		3,0 – 5,0
Concentración del producto final	esp/mL	$1 \cdot 10^9 - 3 \cdot 10^9$
Viabilidad del producto final	UFC/mL	$1 \cdot 10^9 - 3 \cdot 10^9$

Se aplican las siguientes herramientas estadísticas: caracterización estadística, pruebas de normalidad, pruebas de hipótesis y cartas de control.

Para determinar la existencia de una distribución normal se requiere del análisis de tres pruebas a desarrollar, de las cuales dos como mínimo deben comprobarlo. Para la demostración de la distribución normal de este parámetro se llevaron a cabo las siguientes pruebas:

- Se analizan los valores de los coeficientes de curtosis y asimetría los cuales debe estar dentro de un rango de -2 a 2 para considerar dicho caso con una distribución normal.
- La comparación entre el valor de la probabilidad del test de Shapiro-Wilks y el error permisible.
- Construcción del histograma de frecuencia. Si la gaussiana que pasa por los puntos medios de cada barra es simétrica entonces se puede decir que se está en presencia de una distribución normal.

Una vez comprobada la normalidad de las variables se realizan las pruebas de hipótesis a cada una de ellas para saber si cumplen en cada caso con los parámetros operacionales adecuados en el proceso bajo estudio.

La tabla 2.2 muestra las pruebas de hipótesis a realizar para cada variable

Tabla 2.2 Pruebas de hipótesis

Variables	Hipótesis	Variables	Hipótesis
pH del inóculo	$H_0: pH \geq 6,8$ $H_1: pH < 6,8$	pH del PF	$H_0: pH \geq 3$ $H_1: pH < 3$
	$H_0: pH \leq 7$ $H_1: pH > 7$		$H_0: pH \leq 5$ $H_1: pH > 5$
Conc. del inóculo	$H_0: C \geq 5 * 10^5$ $H_1: C < 5 * 10^5$	Conc. del PF	$H_0: C \geq 1 * 10^9$ $H_1: C < 1 * 10^9$
	$H_0: C \leq 1 * 10^6$ $H_1: C > 1 * 10^6$		$H_0: C \leq 3 * 10^9$ $H_1: C > 3 * 10^9$
		Viab. del PF	$H_0: V \geq 1 * 10^9$ $H_1: V < 1 * 10^9$
			$H_0: V \leq 3 * 10^9$ $H_1: V > 3 * 10^9$

Las cartas de control son la herramienta más poderosa para analizar la variación en la mayoría de los procesos. Han sido difundidas exitosamente en varios países dentro de una amplia variedad de situaciones para el control del proceso. Estas gráficas fueron desarrolladas por el Dr. Shewhart en los años 20, son gráficas poligonales que muestran en el tiempo el estado de un proceso. Las cartas de control Shewhart (rango y media), no son más que una comparación gráfica cronológica para determinar las medidas numéricas hechas sobre una calidad. Las variables no estarán fuera de control mientras que: los puntos no estén fuera de los límites, que no existan más de cinco en una misma zona, que no tengan una

tendencia lineal no aleatoria y que no aumente su inestabilidad. Se toman 15 observaciones con cuatro réplicas cada una, y se construyen las cartas de control para media.

Los índices de capacidad permiten cuantificar la capacidad que tiene un proceso de cumplir con las especificaciones, en función del centrado y la variabilidad del proceso. Existen tres tipos de índice de capacidad:

- Índice de capacidad potencial (C_p): Se utiliza para variables de especificación de calidad simple y doble y permite definir la clase y la condición del proceso (tabla 2.3), según criterios de Gutiérrez (2002)

Tabla 2.3 Valores del C_p y clase del proceso (Fuente: Gutiérrez, 2002)

Valor de C_p	Clase del proceso	Decisión
$C_p > 1,33$	1	Más que adecuado
$1 < C_p < 1,33$	2	Adecuado para el trabajo, pero requiere de un control estricto conforme se acerca el C_p a 1.
$0,67 < C_p < 1$	3	No inadecuado para el trabajo. Un análisis de proceso es necesario. Buena posibilidad de éxito
$C_p < 0,67$	4	No adecuado para el trabajo. Requiere de modificaciones serias.

Para variables de doble especificación este índice se calcula por la ecuación 2.1:

$$C_p = \frac{ES - EI}{6 * S} \quad (\text{ec. 2.1})$$

Donde:

\bar{X} : media de la muestra de cada variable

S: desviación estándar de cada variable

ES: límite superior de la especificación

EI: límite inferior de la especificación

Se debe señalar que para el caso de variables con especificación simple, si es una especificación límite superior (\leq) se denota como índice de capacidad superior (C_{ps}) y si es de límite inferior (\geq) índice de capacidad inferior (C_{pi}). En este proceso las variables presentan una especificación con límite inferior, y el índice de capacidad inferior se calcula por la ecuación 2.2:

$$C_{pi} = \frac{\bar{X} - EI}{3 * S} \quad (\text{ec. 2.2})$$

El Anexo 3 muestra el porcentaje de incumplimiento de la norma las variables, según el valor del índice, para una variable con intervalo de especificación o especificación nominal (Gutiérrez, 2002).

- Índice de capacidad real (C_{pk}): Se utiliza para variables con especificación doble y permite determinar no sólo la variabilidad del proceso, sino también el centrado. Se calcula por la ecuación 2.3:

$$C_p = \frac{MC}{3 * S} \quad (\text{ec. 2.3})$$

Donde:

MC: es el valor más pequeño entre $(ES - \bar{X})$ y $(\bar{X} - EI)$.

- Índice de Taguchi (C_{pm}): Es una definición alternativa de los índices del proceso, lo cual se fundamenta en la función de pérdida. Este índice mide mejor que el C_{pk} el centrado y la variabilidad del proceso. Se aplica para todo tipo de especificación, es decir, simple y doble. Se calcula por la ecuación 2.4

$$C_{pm} = \frac{ES - EI}{6 * \tau} \quad (\text{ec. 2.4})$$

Donde:

$$\tau = \sqrt{S^2 + (\bar{X} - N)^2} \quad (\text{ec. 2.5})$$

El valor de N es el valor nominal de la especificación de calidad, en el caso de un intervalo, es el punto medio del intervalo de especificación:

$$N = 0,5 * (ES - EI) \quad (\text{ec. 2.6})$$

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos en el procesamiento estadístico de las muestras, y el análisis de los mismos, definiendo causas que provocan irregularidades en la calidad del producto.

3.1 Análisis de la calidad de la materia prima (inóculo)

La materia prima principal es el inóculo. El pH en el periodo analizado arroja un valor medio igual a 6,39 con un comportamiento estable en el tiempo, pues el coeficiente de variación es de 3,20 % (inferior al 4 %). Sin embargo, la concentración muestra una elevada dispersión, el coeficiente de variación es superior al 12 %, esto se debe a que la concentración tiene un rango permisible de variación (norma) grande (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Resumen de la caracterización de las variables de calidad del inóculo.

Parámetros estadísticos	pH inóculo	Concentración del inóculo
Media (\bar{X})	6,39	263 597,00
Varianza (S^2)	0,04	$1,14 \cdot 10^{10}$ (esp/mL) ²
Desviación estándar (S)	0,20	106 834,00 esp/mL
Valor mínimo	5,9	120 000
Valor máximo	7,0	472 500
Coeficiente de asimetría (CA)	0,84	1,34
Coeficiente de curtosis (CC)	0,89	-1,69
Coeficiente de variación (CV)	3,20 %	40,52 %

Los coeficientes de curtosis y asimetría para ambas variables se encuentran en el rango entre -2 y +2, por lo que esta prueba arroja que ambas muestras presentan

una distribución. Los valores de probabilidad del test de Shapiro Wilks para el pH y la concentración son 0,74 y $6,57 \cdot 10^5$, esto indica que en el caso de la concentración es inferior a 0,05, por lo que no demuestra que presente una distribución normal.

El histograma de frecuencia absoluta para la concentración del inóculo describe una curva gaussiana simétrica. Se puede concluir que los parámetros de calidad del inóculo (pH y concentración) muestran una distribución normal, pues dos pruebas de normalidad dan válidas.

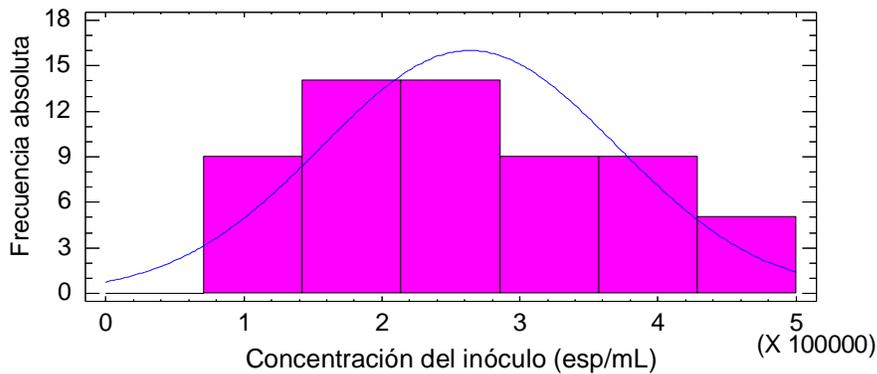


Figura 3.1 Histograma de frecuencia absoluta de la concentración del inóculo.

La tabla 3.2 muestra los resultados de las pruebas de hipótesis para ambas variables. En ninguno de los dos casos cumplen con los límites inferiores de la norma. Romero *et al.*(2015) plantea que el pH del inóculo no debe ser neutro y que los pH levemente ácidos, cercanos a la neutralidad, favorecen más la producción.

Tabla 3.2. Resultados de las pruebas de hipótesis para las variables de calidad del inóculo.

Variables	Hipótesis	p-value	Cumple H_0	Cumple la norma
pH del inóculo	$H_0: \text{pH} \geq 6,8$ $H_1: \text{pH} < 6,8$	0,0	No	No
	$H_0: \text{pH} \leq 7$ $H_1: \text{pH} > 7$	1,0	Si	
Conc. del inóculo	$H_0: C \geq 5 \cdot 10^5$ $H_1: C < 5 \cdot 10^5$	0,0	No	No
	$H_0: C \leq 1 \cdot 10^6$ $H_1: C > 1 \cdot 10^6$	1,0	Si	

La concentración del inóculo no cumple tampoco con los límites inferiores, pero Arévalos y Arias (2008) plantean que, si este parámetro es bajo, se corre el riesgo de contaminación por microorganismos indeseables, además del incremento en el tiempo de fermentación que disminuye la productividad.

La carta de control para media del pH del inóculo (figura 3.2) muestra un comportamiento fuera de control, pero los valores fuera de los límites, se encuentran dentro de la normal.

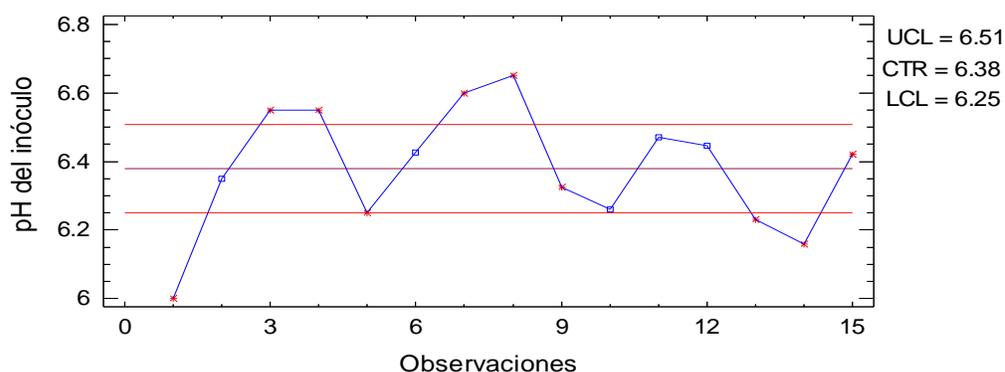


Figura 3.2. Carta de control del pH del inóculo

La carta de control (Figura 3.3) de la concentración describe un comportamiento fuera de control, puntos fuera de los límites inferior y superior. Mientras más concentrado se encuentra el inóculo, permite mayor crecimiento bacteriano. La elevada concentración de inóculo va a favorecer mayor concentración del producto final.

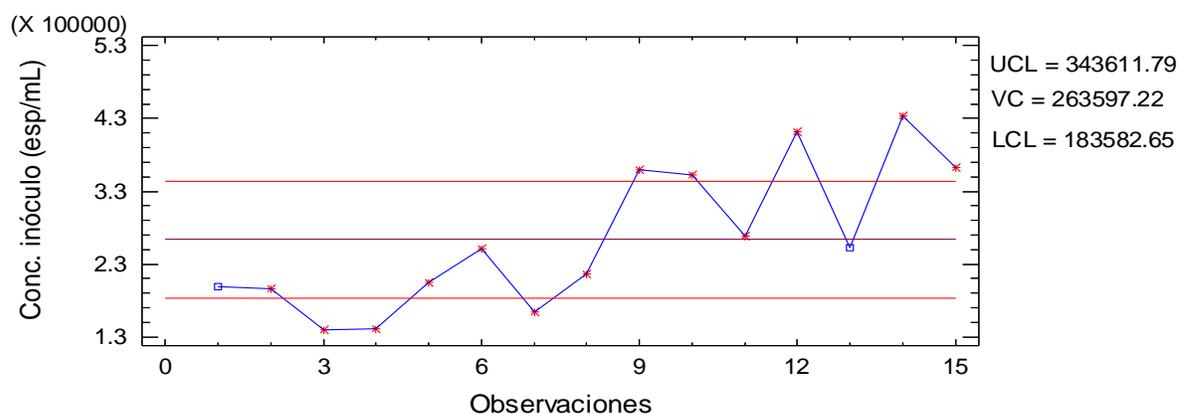


Figura 3.3 Carta de control de la concentración del inóculo

Se puede concluir que el pH y la concentración del inóculo en el período analiza cumple con los requerimientos que favorecen a la producción de *Thurisave-24*.

La tabla 3.3 muestra los índices de capacidad para las dos variables de calidad del inóculo. Para las dos variables los coeficientes de capacidad del proceso son inferiores a 1, por lo que el proceso no es adecuado, según tabla 2.3. En el caso del pH el C_p es menor que 0,67 indicando que es de clase 4 y requiere de modificaciones serias de tratamiento del inóculo, mientras para la concentración el mismo se encuentra entre 0,67 y 1, es decir, de clase 3, proponiendo se analice el proceso. Como ambos son menor que 1, demuestra que el inóculo no cumple con las especificaciones en cuanto a estas dos variables

TABLA 3.3 Índices de capacidad para el pH y la concentración del inóculo

Índice de capacidad	pH de inóculo	Concentración del inóculo
C_p	0,17	0,78
C_{pk}	0,68	0,73
C_{pm}	0,005	0,77

El C_{pk} del pH es superior al C_p , por lo que el proceso está centrado, y según el Anexo 3, alrededor del 45 % de la muestra no cumple las especificaciones.

3.2 Análisis de la calidad del producto

El pH y la viabilidad del producto final presentan estabilidad en el tiempo, no así la concentración, esto se debe que esta variable se mide en una escala mayor y el rango de variación de superior. Solo la concentración presenta el valor del coeficiente de asimetría fuera del rango -2 y 2, que es uno de los criterios que define una distribución normal (Tabla 3.4)

Tabla 3.4. Resumen de la caracterización de las variables de calidad del inóculo.

Parámetros estadísticos	pH	Concentración	Viabilidad
(\bar{X})	6,4	1,89*10 ⁹ esp/mL	1,15*10 ⁹ UFC/mL
S ²	0,03	2,13*10 ¹⁷ (esp/mL) ²	5,41*10 ¹⁵ (UFC/mL) ²
S	0,19	4,61*10 ⁸ esp/mL	7,35*10 ⁷ UFC/mL
CA	1,10	2,29	0,95
CC	0,73	-0,57	-0,96
CV	3,05 %	24,37 %	6,35 %

La tabla 3.5 muestra un resumen de los resultados del test de Shapiro Wilks y de los histogramas de frecuencia (ver Anexo 4), para evaluar la normalidad de las muestras. La concentración del producto final (PF) no cumple con una distribución normal, por lo que no se le aplicarán a la muestra ni prueba de hipótesis ni cartas de control.

Tabla 3.5. Resumen de las pruebas de normalidad.

Variables	Valor de p	Histograma de frecuencia con curva gaussiana	Coefficientes de curtosis y asimetría (-2 y 2)	Distribución normal
pH del PF	0,075	Sí	Si	Cumple
Concentración del PF	0,004	No	No	No cumple
Viabilidad del PF	0,062	Sí	Sí	Cumple

Valor de p: valor de probabilidad en test de Shapiro Wilks

La viabilidad del producto final cumple con las especificaciones requeridas, no así el pH que no cumple con el límite inferior de la norma (tabla 3.6). Esto no afecta la calidad del producto final, si fuera muy alto sí afectaría las propiedades del suelo, y

a los cultivos. Para cumplir con este requisito, de que sea inferior a 5, se le añade un conservante (ácido sórbico).

Tabla 3.6. Resumen de las pruebas de hipótesis para el PF

Variabes	Hipótesis	p-value	Cumplimiento de H_0	Cumplimiento de la norma
pH del PF	$H_0: pH \geq 3$ $H_1: pH < 3$	1,0	Sí	No
	$H_0: pH \leq 5$ $H_1: pH > 5$	0,0	No	
Viabilidad del PF	$H_0: V \geq 1 * 10^9$ $H_1: V < 1 * 10^9$	1,0	Sí	Sí
	$H_0: V \leq 3 * 10^9$ $H_1: V > 3 * 10^9$	1,0	Sí	

La figura 3.4 muestra puntos fuera de los límites, pero esto no afecta la calidad del producto fina, se provoca por la sensibilidad que presentan los medios de cultivos microbianos.

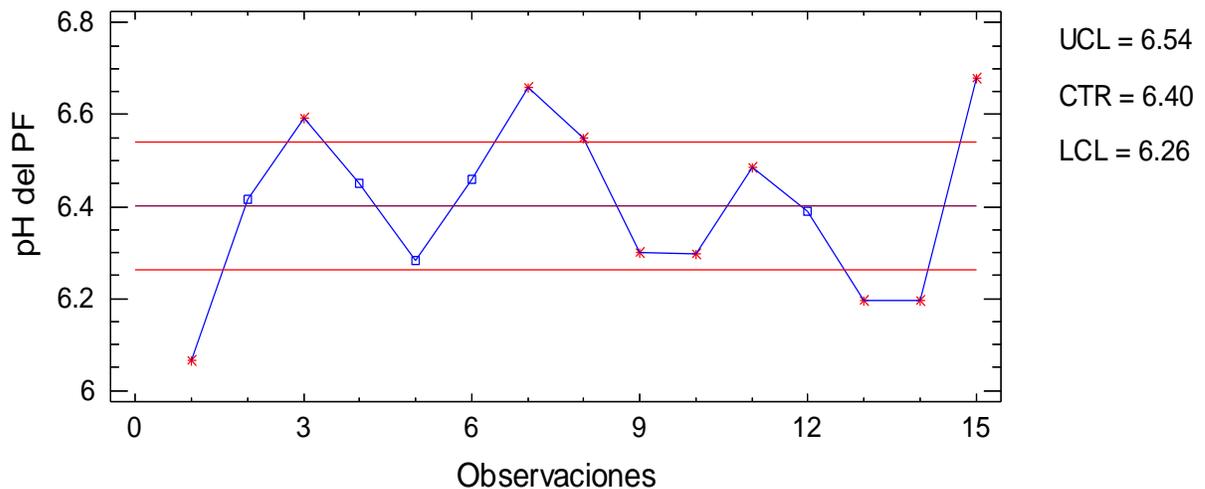


Figura 3.4. Carta de control para media del pH del producto final

La viabilidad del producto final presenta una tendencia irregular, debido a la variación en el crecimiento microbiano en el proceso, provocado por la sensibilidad del mismo.

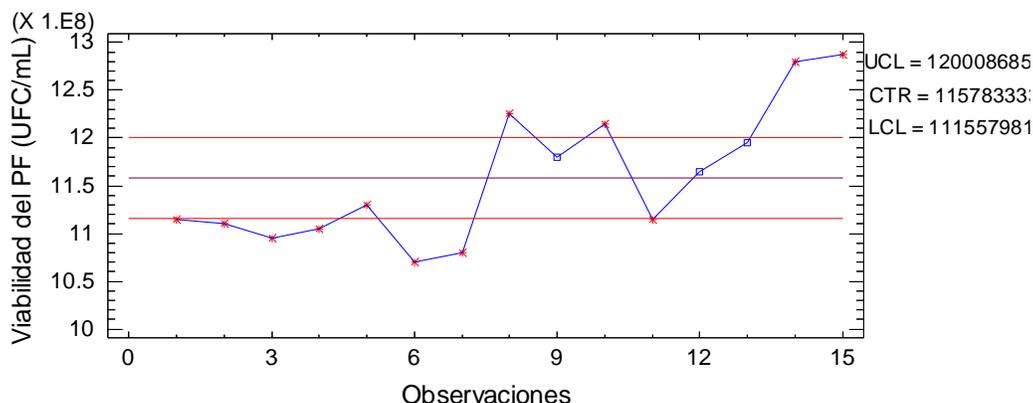


Figura 3.5. Carta de control para media de la viabilidad del producto final

La tabla 3.7 muestra los índices de capacidad para las dos variables de calidad del producto final. Para ambas variables los coeficientes C_p y C_{pk} son superiores a 1, indicando que si cumplen con las especificaciones. En el caso del C_p , ambos son superior a 1,33, por lo que es más que adecuado el producto, siendo de clase 1 (Tabla 2.3). En cuanto al centrado, sólo el pH tiene un comportamiento centrado, pues el C_{pk} es superior al C_p .

TABLA 3.7 Índices de capacidad para el pH y la concentración del inóculo

Índice de capacidad	pH del producto final	Viabilidad del producto final
C_p	1,70	4,53
C_{pk}	2,39	0,71
C_{pm}	1,06	1,91

3.3. Conclusiones parciales del capítulo

El inóculo no cumple con las especificaciones requeridas, y la concentración del inóculo presenta una elevada dispersión. Según los coeficientes de capacidad deben tomarse medidas serias, para lograr mejor control de esta materia prima.

El producto final cumple con las especificaciones de calidad en cuanto a la viabilidad, aunque muestra gran dispersión debido a ser una propiedad con una escala de medida amplia. Los coeficientes de capacidad demuestran que el producto está bajo control.

CONCLUSIONES

Después de realizar la investigación se concluye que:

- El inóculo *Bacillus Thuringiensis* no cumple con las especificaciones requeridas en cuanto al pH y la concentración.
- Los coeficientes de capacidad del pH y la concentración son 0,17 y 0,78 respectivamente, es decir, de clase 1, indicando que debe realizarse un tratamiento serio del mismo.
- El producto final sólo cumple con las especificaciones de calidad en cuanto a la viabilidad, aunque muestra gran dispersión debido a ser una propiedad con una escala de medida amplia.
- Los coeficientes de capacidad del pH y de la viabilidad del producto final son 1,70 y 4,53, por lo que el producto está bajo control.
- La concentración del producto final no presenta una distribución normal, debido a la gran dispersión que presenta.

RECOMENDACIONES

Se recomienda para estudios posteriores realizar un análisis de control de calidad de las variables operacionales del proceso.

BIBLIOGRAFIA

- Agathos, S. N. (2018). Mass production of viral insecticides. In *Biotechnology for biological control of pests and vectors* (pp. 217-232). CRC Press.
- Almeida, V. E. S. D., Friedrich, K., Tygel, A. F., Melgarejo, L., y Carneiro, F. F. (2017). Use of genetically modified crops and pesticides in Brazil: growing hazards. *Ciencia & saude coletiva*, 22, 3333-3339.
- Aquino López, T. (2020). Nocividad de *Strategus aloeus* L. en dos especies de Agave y su manejo a base de hongos entomopatógenos asociados en aceites.
- Arévalo, H., Arroyo, G. C. (2008). Determination of the concentration of inoculo and time of fermentation, utilizing microbiota of the kefir grains as biological agent and serum of milk as substrate. *Ciencia e Investigación*, 11 (2). ISSN 1561-0861
- Bautista, E. J., Mesa, L., y Gómez Alvarez, M. I. (2018). Alternativas de producción de bioplaguicidas microbianos a base de hongos: el caso de América Latina y El Caribe. *Scientia Agropecuaria*, 9(4), 585-604.
- Biryol, S., Güney, E., Eski, A., Bayramoğlu, Z., Sezen, K., Demirbag, Z., y Demir, İ. (2021). Development of mycoinsecticide formulations with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum* for the control of *Orosanga japonica* (Hemiptera: Ricaniidae). *Annals of Applied Biology*.
- Carbajal, A.; Sánchez, M.; Romero, E. (2019). Bioplaguicidas: Un sustituto de los plaguicidas químicos. *RD-ICUAP*, 5(13).
- Carreño, C. (2020). Análisis del efecto de hongos entomopatógenos como control biológico sobre la plaga de pulgón.
- Cheng, P., Wu, L., Ziniu, Y., y Aronson, A. (1999). Subspecies-dependent regulation of *Bacillus thuringiensis* protoxin genes. *Applied and environmental microbiology*, 65(5), 1849-1853.
- Cristóbal, J., Ramos, J. A., Basto, C., y Herrera, E. (2021). Hongos micorrícicos arbusculares como control biológico del nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.) en hortalizas de Yucatán. *Bioagrobiencias*, 14(1).

Díaz, E., Ruiz, D. (2009). Herramientas para el control de procesos. Universidad Nacional Experimental de Guayana. Ingeniería en Industrias Forestales. Disponible en www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ingenieria/tesis73.pdf

Fernández, M. Á. C. (2017). *MF0665_3-Gestión de la calidad y medioambiental en industrias de proceso*. Editorial Elearning, SL.

Frias, M. Domínguez, D; Fernández, J., Sordo, C. M. (2012). Estadística. Tema 7: Control estadístico de la calidad. Departamento de Matemática Aplicada y Ciencias de la Computación. Universidad de Cantabria. Tema publicado bajo Licencia: Creative Commons BY-NC-SA 3.0.

García, C. O. R., y González, L. C. (2021). Empleo de *Trichoderma* spp. para el control de enfermedades y producción más limpia en lechuga. *Revista Ambiental Agua, Aire y Suelo*, 11(2).

Georgieva, O., Karadzhova, N., y Kalapchieva, S. (2021). APPLICATION OF BIOLOGICAL PRODUCTS AT CULTIVATION OF GARDEN PEA *PISUM SATIVUM* L. *Agricultural Sciences/Agrarni Nauki*, 13(29).

Gómez, J., y Villamizar, L. Los entomopatógenos: una alternativa segura para el control biológico de plagas agrícolas. *PATROCINADOR OFICIAL*, 206.

Halawa, B., Azwana, A., y Panggabean, E. L. (2019). Sensitivity of Larva *Spodopteralitura* Against the Density of Spores of Fungi *Metarhizium anisopliae* on the Onion Plant Red (*Allium cepa*) in the Laboratory. *Budapest International Research in Exact Sciences (BirEx) Journal*, 1(1), 35-41.

Hernández, D. J., Ferrera, R., y Alarcón, A. (2019). *Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 35(1), 98-112.

Hu, G., y St. Leger, R. J. (2002). Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6383-6387.

Huang, H., Zhao, Y., Xu, Z., Ding, Y., Zhou, X., y Dong, M. (2020). A high Mn (II)-tolerance strain, *Bacillus thuringiensis* HM7, isolated from manganese ore and its biosorption characteristics. *PeerJ*, 8, e8589.

Huerga, M.C., Abad, J. I. (2004). Herramientas estadísticas en el control y mejora de la calidad. Una aplicación en la industria agroalimentaria. Anales de Economía Aplicada. XIV Reunión ASEPELT. Universidad de Oviedo. España. ISBN 86-699-2357-9.

Jimenez, A. D. (2019). Bacterias entomopatógenas como alternativa para el biocontrol de plagas.

Juran, G. F. (1995) Análisis y Planeación de la Calidad. 3a ed. McGraw-Hill. Madrid, España. 633 p.

Kaur, R., Mavi, G. K., Raghav, S., y Khan, I. (2019). Pesticides classification and its impact on environment. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 8(3), 1889-1897.

Kumar, P., Kamle, M., Borah, R., Mahato, D. K., y Sharma, B. (2021). *Bacillus thuringiensis* as microbial biopesticide: uses and application for sustainable agriculture. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 1-7.

Leal, M. L., de Jesús, P., Cruz, E., Aguilar, E. E., Perea, X. P., Martínez, I. G., y Leyva, J. B. (2022). Pesticides in water and sediments of Chacahua-Pastoria Lagoon System, Oaxaca, Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 174, 113177.

Li, Y., Ali, A., Jeyasundar, P. G. S. A., Azeem, M., Tabassum, A., Guo, D., ... y Zhang, Z. (2021). *Bacillus subtilis* and saponin shifted the availability of heavy metals, health indicators of smelter contaminated soil, and the physiological indicators of *Symphytum officinale*. *Chemosphere*, 285, 131454.

López, A. I. S., Pazos, V., y Torres, D. (2005). Aislamiento y selección de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* con potencialidades para el control biológico en semilleros de tabaco. *Centro Agrícola*, 32(3), 25-29.

Machado, E. B., Sousa, N. J., y Moscardi, F. (2017). Eficiência em campo de diferentes concentrações de Condylorrhiza vestigiais multiple nucleopolyhedrovirus no controle de Condylorrhiza vestigiais. *FLORESTA*, 47(2), 207-212.

Manasfi, R., Chiron, S., Montemurro, N., Perez, S., y Brienza, M. (2020). Biodegradation of fluoroquinolone antibiotics and the climbazole fungicide by *Trichoderma* species. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(18), 23331-23341.

Mantilla A, J. G., Gaitan B, A. L., y Gongora B, C. E. (2004). Identificación y caracterización de genes responsables de la patogenicidad de *Beauveria bassiana*/Bb205 hacia la broca del café/*Hypothenemus hampei*/ (Coleoptera: Scolytidae). In *CONGRESO de la Sociedad Colombiana de Entomología* (Vol. 31, pp. 28-30).

Márquez, M. E., Vázquez, L. L., Rodríguez, M. G., Sifontes, J. L. A., Fuentes, F., Ramos, M., ... y Herrera, L. (2019). 10 Biological Control in Cuba. *Biological Control in Latin America and the Caribbean: Its Rich History and Bright Future*, 12, 176.

Martínez, A. (2010). Métodos estadísticos para el control de la calidad y la mejora continua en la industria de la transformación. Tesis para optar por el título de Administrador Industrial. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F.

Martinez, D. A., Loening, U. E., Graham, M. C., y Gathorne-Hardy, A. (2021). When the Medicine Feeds the Problem; Do Nitrogen Fertilisers and Pesticides Enhance the Nutritional Quality of Crops for Their Pests and Pathogens? *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 234.

Miranda, M. D. S., Mayorga, L. F. M., y Aguilera, L. A. P. (2021). Identificación morfológica y molecular de especies autóctonas *Trichoderma* spp., aisladas de suelos de importancia agrícola. *Revista Ciencia y Tecnología El Higo*, 11(1), 26-42.

Montgomery, D. (2014). *Statistical Quality Control*. Ed. John Wiley. New York.

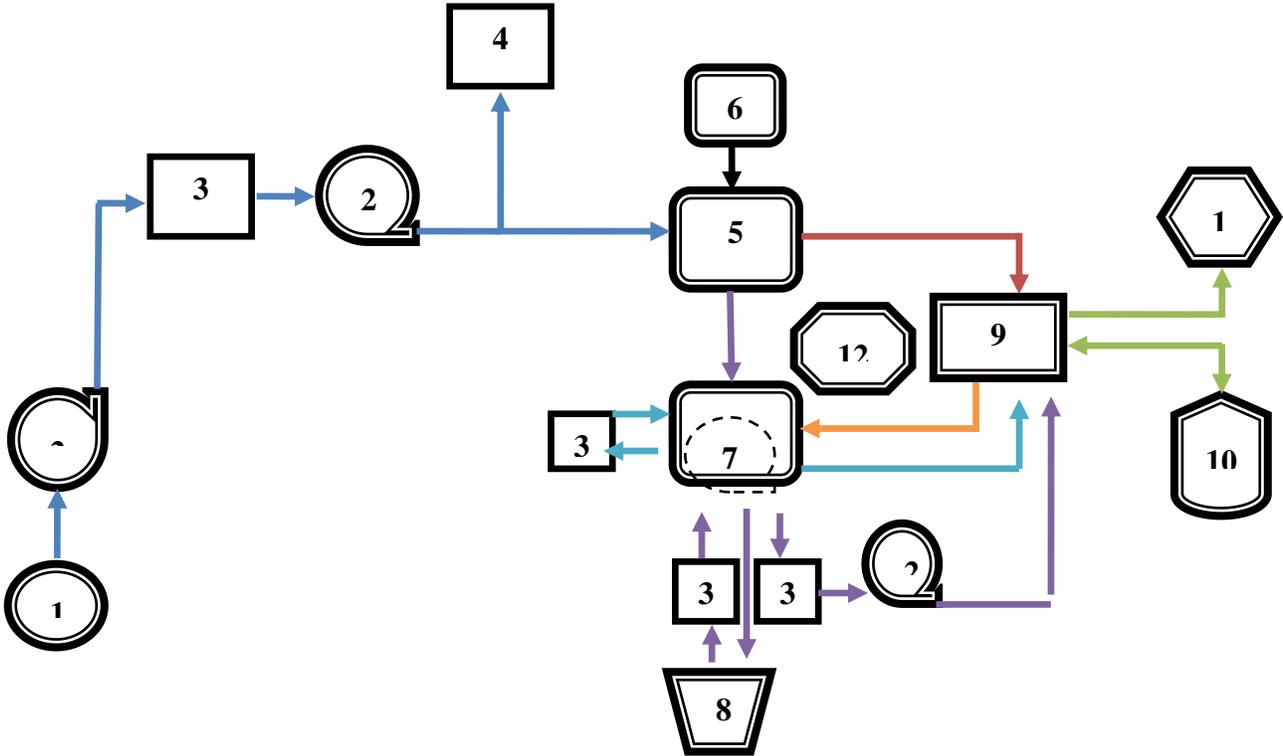
Montoya, M. P. G. (2017). Implementación de herramientas de control de calidad en MYPEs de confecciones y aplicación de mejora continua PHRA. *Industrial data*, 20(2), 95-100.

Nava, E., García, C., Camacho, J. R., y Vázquez, E. L. (2012). Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*, 8(3), 17-29.

- Otieno, H. M. (2019). Pesticide training tool: A simplified guide for Agricultural Extension Officers and Farmers. *Asian Journal of Research in Crop Science*, 1-5.
- Pohare, M. B., Wagh, S. G., y Udayasuriyan, V. (2021). Bacillus thuringiensis as Potential Biocontrol Agent for Sustainable Agriculture. In *Current Trends in Microbial Biotechnology for Sustainable Agriculture* (pp. 439-468). Springer, Singapore.
- Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., y Megharaj, M. (2019). Local applications but global implications: Can pesticides drive microorganisms to develop antimicrobial resistance? *Science of the Total Environment*, 654, 177-189.
- Reinaldo, J. R. M. (2020). Microorganismos eficientes y su empleo en la protección fitosanitaria de los cultivos. *Revista Científica Agroecosistemas*, 8(2), 102-109.
- Rodríguez, R., Armijo, L. F., y López, J. I. (2020). Inducción de la germinación de conidios de los hongos entomopatógenos Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae y el micoparásito Trichoderma harzianum. *Bioteconología y Sustentabilidad*, 5(1), 48-61.
- Romero, F., Camelo, M., Criollo, P., Bonilla, R. (2015). Efecto de la temperatura y el pH en la producción de biomasa de *Azospirillum brasilense* C16 aislada de pasto guinea. *Pastos y Forrajes*, 38 (3).
- Rouphael, Y., Carillo, P., Colla, G., Fiorentino, N., Sabatino, L., El-Nakhel, C., ... y Woo, S. L. (2020). Appraisal of combined applications of Trichoderma virens and a biopolymer-based biostimulant on lettuce agronomical, physiological, and qualitative properties under variable N regimes. *Agronomy*, 10(2), 196.
- Santos, A. O. D., Ueda-Nakamura, T., DiasFilho, B. P., Veiga Junior, V. F., Pinto, A. C., y Nakamura, C. V. (2008). Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the Copaifera genus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(3), 277-281.
- Sarwar, M. (2015). The dangers of pesticides associated with public health and preventing of the risks. *International Journal of Bioinformatics and Biomedical Engineering*, 1(2), 130-136.

- Sarwar, M. (2020). Experimental Induction of Insect Growth Regulators in Controls of Insect Vectors as well as Crops and Stored Products Pests. *Specialty Journal of Agricultural Sciences*, 6(1), 32-41.
- Silva, E., y Tapia, E. (2020). Plaguicidas microbianos para el manejo integrado de *Lobesia botrana* en vides.
- Simberloff, D. (2012). Risks of biological control for conservation purposes. *BioControl*, 57(2), 263-276.
- Varela, M. A. (2021). *Evaluación de la efectividad de Trichoderma Spp. para el control del complejo de hongos causantes de la pudrición basal en Gypsophila (Gypsophila Paniculata), parroquia Chávezpamba, San José de Minas* (Bachelor's thesis).
- Wang, J. J., Bai, W. W., Zhou, W., Liu, J., Chen, J., Liu, X. Y., ... y Wan, Y. J. (2017). Transcriptomic analysis of two *Beauveria bassiana* strains grown on cuticle extracts of the silkworm uncovers their different metabolic response at early infection stage. *Journal of invertebrate pathology*, 145, 45-54.
- Wang, M., Geng, L., Xue, B., Wang, Z., Xu, W., Shu, C., y Zhang, J. (2021). Structure characteristics and function of a novel extracellular polysaccharide from *Bacillus thuringiensis* strain 4D19. *International Journal of Biological Macromolecules*, 189, 956-964.
- Wilson, K., Grzywacz, D., Curcic, I., Scoates, F., Harper, K., Rice, A., ... y Dillon, A. (2020). A novel formulation technology for baculoviruses protects biopesticide from degradation by ultraviolet radiation. *Scientific Reports*, 10(1), 1-10.
- Wood, H. A. (2018). Development of genetically enhanced baculovirus pesticides. In *Biotechnology for Biological Control of Pests and Vectors* (pp. 69-76). CRC Press.
- Zapata, L. G. (2020). El complejo *Xyleborus glabratus-Rafaela lauricola* en México: un análisis sobre los costos económicos asociados con la plaga.

Anexo 1: Diagrama de flujo



Leyenda:

- 1- Pozo.
- 2- Bombas Centrifugas.
- 3- Cisternas.
- 4- Tanque Elevado.
- 5- Sala de Caldera.
- 6- Tanque de Combustible.
- 7- Sala de Refrigeración.
- 8- Torre de Enfriamiento.
- 9- Sala de Fermentación.
- 10- Laboratorio.
- 11- Sala de Envase.
- 12- Grupo Electrónico.

Anexo 2. Valores de las variables analizadas

pH del inóculo	Conc (esp/mL) del inóculo	pH del PF	Conc (esp/mL) del PF	Viab (UFC/mL) del PF
6	300000	5.97	20000000 00	10800000 00
5.9	227500	6	19600000 00	11000000 00
6	127500	6.1	23000000 00	11400000 00
6.1	140000	6.2	21200000 00	11400000 00
6.2	197500	6.3	24600000 00	11400000 00
6.3	197500	6.4	24000000 00	11400000 00
6.4	197500	6.47	23000000 00	11000000 00
6.5	190000	6.5	19600000 00	10600000 00
6.5	120000	6.5	19800000 00	11000000 00
6.5	140000	6.57	19400000 00	11000000 00
6.5	145000	6.63	19800000 00	11000000 00
6.7	152500	6.67	22600000 00	10800000 00
6.7	150000	6.6	26000000 00	11200000 00
6.6	137500	6.5	29000000 00	10800000 00
6.5	140000	6.4	26000000 00	11000000 00
6.4	137500	6.3	22600000 00	11200000 00
6.3	140000	6.23	20800000 00	11600000 00
6.2	145000	6.23	17400000 00	11200000 00
6.2	240000	6.3	15800000 00	11200000 00
6.3	295000	6.37	16000000 00	11200000 00

6.4	302500	6.4	17200000 00	11000000 00
6.4	315000	6.43	16600000 00	10600000 00
6.4	222500	6.47	16200000 00	10600000 00
6.5	165000	6.53	14400000 00	10600000 00
6.5	150000	6.57	15400000 00	10000000 00
6.6	135000	6.63	15800000 00	10400000 00
6.6	145000	6.7	14600000 00	11200000 00
6.7	227500	6.73	16600000 00	11600000 00
6.8	230000	6.7	18400000 00	12000000 00
6.7	235000	6.6	17000000 00	12200000 00
6.6	235000	6.5	16000000 00	12400000 00
6.5	167500	6.4	16800000 00	12400000 00
6.4	265000	6.33	15400000 00	12000000 00
6.3	327500	6.3	13600000 00	11600000 00
6.3	435000	6.3	13800000 00	11800000 00
6.3	412500	6.26	13200000 00	11800000 00
6.3	410000	6.24	13000000 00	11600000 00
6.2	407500	6.24	13600000 00	12200000 00
6.22	280000	6.32	13800000 00	12600000 00
6.32	312500	6.38	13600000 00	12200000 00
6.42	235000	6.45	16000000 00	11600000 00
6.42	207500	6.48	15600000 00	11400000 00
6.52	282500	6.52	14800000 00	10800000 00

6.52	350000	6.48	15000000 00	10800000 00
6.52	422500	6.45	15200000 00	11200000 00
6.42	472500	6.42	13400000 00	11800000 00
6.42	425000	6.38	13400000 00	11800000 00
6.42	325000	6.30	16400000 00	11800000 00
6.3	265000	6.23	16200000 00	11800000 00
6.2	177500	6.20	19600000 00	12000000 00
6.2	250000	6.18	19600000 00	12000000 00
6.22	320000	6.16	22000000 00	12000000 00
6.12	377500	6.14	20800000 00	12600000 00
6.14	462500	6.16	22600000 00	13000000 00
6.17	432500	6.20	22600000 00	12800000 00
6.2	462500	6.26	25600000 00	12800000 00
6.25	410000	6.36	25750000 00	13000000 00
6.33	383333.33	6.61	27333333 33	13000000 00
6.5	385000	6.75	30000000 00	12500000 00
7	270000	7	30000000 00	13000000 00

ANEXO 3. Relación de los índices de capacidad potencial y de capacidad real con el porcentaje de incumplimiento de la norma

Valor del índice	% fuera de la especificación	
	Variable con doble especificación	Variable con una sola especificación
0,25	45,33	22,66
0,50	13,36	6,68
0,60	7,19	3,59
0,70	3,57	1,79
0,80	1,64	0,82
0,90	0,69	0,35
1,00	0,27	0,135
1,10	0,97	0,048
1,20	0,032	0,016
1,30	0,010	0,005
1,40	0,003	0,0014
1,50	0,0007	0,0004
1,60	0,00002	0,0001

Fuente: Gutiérrez (2002)

ANEXO 4. Histograma de frecuencia para la viabilidad del producto final

