



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL

Efecto del pH y temperatura en sanguaza para la producción de endotoxina Cry de *Bacillus thuringiensis* como biopesticida.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE

Ingeniera Ambiental

AUTORES:

Diana Carolina Aguilar Lozada (ORCID: 0000-0002-3364-5601)

Jazahel Naomi Julca Reyes (ORCID: 0000-0003-4033-688)

ASESOR:

Msc. Isidoro Valderrama Ramos (ORCID: 0000-0003-4001-3255)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Tratamiento y Gestión de los Residuos

Trujillo – Perú

2019

Dedicatoria

A Dios

Por darnos la vida y por estar siempre con nosotras en cada paso que damos, y por fortalecer nuestro corazón e iluminar nuestro camino

A nuestros Padres

El esfuerzo y las metas alcanzadas, son reflejo de dedicación y amor que invierten nuestros padres y toda nuestra familia. Gracias a nuestros padres somos quienes somos, y se los dedicamos por que han sido nuestro sustento en todo momento para realizar esta Tesis.

A nuestros asesores

Por brindarnos su sabiduría, conocimiento, experiencia y motivación a desarrollarnos como personas y profesionales en la Universidad Cesar Vallejo, y agradecer por sus enseñanzas brindadas en los momentos de dificultad.

Agradecimiento

Agradecemos a todas las personas que hicieron posible esta investigación y que de alguna manera estuvieron con nosotras en los momentos difíciles, alegres, y tristes. Estas palabras son para ustedes. A nuestros padres por todo su amor, comprensión y apoyo, pero sobre todo gracias al infinitas al Instituto de Investigación en Ciencia y Tecnología de la Universidad César Vallejo especialmente al Dr. Luis Alberto Cabanillas Chirinos por brindarnos sus conocimientos para realizar el desarrollo de nuestra investigación.

Página del Jurado

Declaratoria de Autenticidad

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo Jazahel Naomi Julca Reyes con DNI N° 70302712 con el fin de cumplir con las disposiciones consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Cesar Vallejo, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Ambiental, declaro bajo juramento que toda la documentación que acompaño es veraz y autentica.

Así mismo, declaro bajo juramento que todos los datos e información que se presenta en la presente tesis son auténticos y veraces.

En tal sentido asumo la responsabilidad ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas de la Universidad Cesar Vallejo.

Trujillo, 10 de mayo del 2019



Firma

Jazahel Naomi Julca Reyes

DNI: 70302712

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo Diana Carolina Aguilar Lozada con DNI N° 71017542 con el fin de cumplir con las disposiciones consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Cesar Vallejo, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Ambiental, declaro bajo juramento que toda la documentación que acompaño es veraz y autentica.

Así mismo, declaro bajo juramento que todos los datos e información que se presenta en la presente tesis son auténticos y veraces.

En tal sentido asumo la responsabilidad ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas de la Universidad Cesar Vallejo.

Trujillo, 10 de mayo del 2019



Diana Carolina Aguilar Lozada
DNI: 71017542

Firma

Índice

Dedicatoria	ii
Agradecimiento.....	iii
Página del Jurado	iv
Declaratoria de Autenticidad.....	v
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. MÉTODO	12
2.1 Tipo y diseño de investigación	12
2.2 Operacionalización de variables.....	13
2.3 Población, muestra y muestreo.....	14
2.3.1 Población	14
2.3.2 Muestra	14
2.3.3 Unidad de análisis	14
2.3.4 Muestreo	14
2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.....	14
2.4.1 Validez y confiabilidad de las técnicas de recolección de datos	14
2.4.2 Validez y confiabilidad de instrumentos de Recolección de datos.....	14
2.5 Procedimiento.....	14
2.6 Método de análisis de datos	17
2.7 Aspectos éticos	17
III. RESULTADOS.....	18
IV. DISCUSIÓN	22
V. CONCLUSIONES.....	26
VI. RECOMENDACIONES	27
REFERENCIAS	28
ANEXOS.....	34

RESUMEN

La presente investigación, consistió en demostrar el efecto del pH y temperatura en sanguaza para la producción de endotoxina Cry de *Bacillus thuringiensis* como biopesticida. La unidad muestral fue conformada por 500 mililitros de sanguaza por cada tratamiento con la finalidad de incrementar el crecimiento y desarrollo de la bacteria. Para llevar acabo los experimentos se utilizaron 4 biorreactores, uno con capacidad de 5L donde se preparó el medio de cultivo con sanguaza y los tres restantes con capacidad de 1L para someter a la bacteria a las condiciones de estrés previamente establecidas. Este trabajo de investigación requirió de un diseño factorial, cuyas variables manipuladas consistieron de dos niveles cada una; el pH (6,8) y de temperaturas (25, 35 y 45), las cuales fueron combinadas, obteniéndose un total de 6 experimentos a los cuales se le realizó tres repeticiones. Para el análisis estadístico se utilizó el ANOVA de dos factores con la finalidad de determinar que variables o combinaciones influyen, en la producción de la endotoxina Cry. Así mismo, se realizó las pruebas post hoc para identificar qué nivel de temperatura era el más óptimo para la producción de la endotoxina Cry. Por tanto, se llegó a determinar, que en un pH 6 y en una temperatura de 35°C, se obtiene la máxima producción, cuyo valor aproximado es de $497.3 \cdot 10^6$ UE/ml. En conclusión, se llegó a demostrar que efectivamente existe influencia por parte de las variables independientes en la producción de la endotoxina Cry, utilizando la sanguaza como tratamiento.

Palabras claves: Sanguaza, Endotoxina Cry, *Bacillus thuringiensis*.

ABSTRACT

The present investigation consisted of establishing the pH effect and temperature on blood for the production of Cry endotoxin from *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. The sample unit was made up of 500 milliliters of blood for each treatment in order to increase the growth and development of the bacteria. To carry out the experiments, 4 bioreactors were used, one with a capacity of 5L where the culture medium was prepared with bloodletting and the remaining three with a capacity of 1L to subject the bacteria to the previously established stress conditions. This research work required a factorial design, whose manipulated variables consisted of a pH (6.8) and temperatures (25, 35 and 45), which were combined, obtaining a total of 6 experiments which were performed Three repetitions For the statistical analysis, the bifactorial ANOVA was used in order to determine which variables or combinations influence the production of the Cry endotoxin. Likewise, post hoc tests were performed to identify which temperature level was the most optimal for the production of Cry endotoxin. Therefore, it was determined that at a pH 6 and at a temperature of 35 ° C, maximum production is obtained, whose approximate value is $497.3 \cdot 10^6$ UE / ml. In conclusion, it was demonstrated that there is indeed influence on the part of the independent variables in the production of the Cry endotoxin, using blood as treatment.

Keywords: Sanguaza, Cry Endotoxin, *Bacillus thuringiensis*

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha habido un interés creciente en los efluentes provenientes de las plantas de producción de harina y aceite de pescado, pues generan contaminación por su alto contenido en sangre, pelusa, grasas, y otros (Paredes, 2014, p. 74). Los parámetros físicos, químicos y biológicos, que contiene el agua, al ser excedidos causan daños en la salud y al ambiente (Muñoz, 2017, p. 287). Por otra parte, la presencia en exceso de restos de desechos en el agua ocasiona un incremento de nutrientes, provocando pérdidas por la eutrofización y muerte de especies marinas. Particularmente en México en la bahía de Guaymas, al año se vierten 8 756 ton de residuos sólidos que aproximadamente son 120 mil toneladas de sanguaza o agua de cola, que provoca la degradación de sus recursos naturales (FAO,210, p. 57). Así mismo el Perú también tiene este problema y esto lo demuestra Pisco y Paracas donde existen centros de elaboración de harina de pescado, conjuntamente desechos líquidos urbanos, municipales y en menor sector agrícola, es indudable que la contaminación de la bahía este ocasionando problemas ecológicos, económicos y sociales (Muñoz, 1996 , p.2).

Esta misma realidad presenta el puerto Malabrigo, en la provincia de Ascope, donde alberga a varias empresas pesqueras que generan desechos y sanguaza que son arrojados, los cuales ocasionan grandes daños ya que muchas veces no hay una buena disposición de este tipo de residuos, por lo que se busca que pasen por un previo tratamiento (Zabaleta, 2010, p19).

La sanguaza se genera como parte de distintos procesos que siguen las empresas en la industria pesquera, la cual contiene gran cantidad de proteínas, grasas, etc. Esta al ser vertida libremente genera contaminación del agua ya que al no estar tratada puede causar daños como muertes de especies marinas, ecosistemas (Robles, 2005, p. 2-54), cuando aún este residuo puede ser aprovechado por los nutrientes que la componen.

Esto lo demuestra SELLAMUTHU. Balasubramanian y RAJESHWAR, Tyagi, pertenecientes a los Institut National De La Recherche Scientifique y INRS-ETE (2017) respectivamente, presentan su estudio "*Biopesticide production from solid wastes*", donde aprovecha los nutrientes de los residuos para la producción de un biopesticida usando *Bacillus thurigiensis*, además discute acerca de la viabilidad de este tipo de proyectos, mencionando que si el reemplazo del medio sintético por residuos sólidos, el costo de producción se puede reducir

y aumentar los beneficios. Este estudio hace referencia al que se realizó utilizando desechos sólidos de cocina en fermentación en estado sólido. El medio de cultivo óptimo se hizo con residuos de cocina (55.21%), salvado de trigo (22.08%), polvo de torta de soja (11.04%), cascara de grano (11.04%) e iones mixtos (0.63%). Estas condiciones optimizadas después de 48 h revelaron un recuento de esporas de 5.0×10^{10} cfu/g y 15,200 UI / mg de cristales, mientras que un medio sintético reveló un conteo de esporas de $2,51 \times 10^{10}$ cfu/g y 12,900 UI / mg de cristales, concluyendo con que este era un método alternativo para la eliminación de residuos sólidos.

Otros estudios como “*Use of coffee husk waste for production of biopesticides for mosquito control*” realizado por SUBBIAH Poopathi y CHINNASAMY, Mani (2015) demuestra que en dichos residuos se acumulan hidratos de carbono (carbono y nitrógeno), por lo que fue usado como extracto para B y BTI para la producción de toxinas mosquitocidal, los bioensayos de B y BTI toxinas contra larvas de mosquitos en este trabajo mostraron una toxicidad considerable, es evidente a partir del modo de acción de las toxinas que la toxicidad se debe a la unión de las toxinas de cristal activos a receptores específicos presente en la membrana del borde del cepillo del intestino medio larvario. Las toxinas de cristal de complejo espora / cristal son ingeridos inicialmente, junto con los materiales alimenticios, por las larvas de mosquitos, y después de la solubilización y la escisión proteolítica, la toxina activado interactúa con intestino medio epithelium, lo que lleva a la muerte de las larvas. Y, por lo tanto, los resultados de los bioensayos sugieren que las toxinas producidas a partir de CHW tuvieron toxicidad larvicida similar a la de un medio convencional, siguiendo el modo habitual de acción.

En España, BALLARDOS, Cindy. et.al, en su investigación “*A novel strategy for producing compost with enhanced biopesticide properties thorough solid-state fermentation of biowaste and inoculation with Bacillus thuringiensis*”(2017), aplicó la fermentación en estado sólido de residuos biodegradables de residuos sólidos urbanos a escala de laboratorio para su uso como sustrato para *Bacilo turingiensico* (Bt), en crecimiento en condiciones no estériles en un reactor de 10 L, estableciendo un proceso semicontinuo produciendo un material de compostaje como orgánico estabilizado enriquecido con Bt adecuados para uso como una enmienda del suelo, obteniendo como resultado en el material final las concentraciones de 1.7×10^7 – 2.2×10^7 and 1.3×10^7 – 2.1×10^7 CFU g-1 para las células y esporas viables de Bt, respectivamente, confirmando así que el material de compostaje enriquecido con Bt con potenciales propiedades biopesticidas puede ser producido a partir de residuos biológicos no estéril.

Así mismo según CARBALLAR, Rebeca, et. all, (2014), presentan su estudio “*Use of spent mushroom substrate for production of Bacillus thuringiensis by solid-state fermentation*”, donde su objetivo fue explorar distintos medios para la producción en masa de *Bacillus thuringiensis* (Bt) mediante fermentación en estado sólido, dando uso a un subproducto agroindustrial, el sustrato de hongos gastados (SMS), obteniendo como medio de cultivo óptimo el compuesto por 10gr SMS, 0.3 gr CaCO₃, 25 ml de agua destilada, 4 gr de trigo de soya , 0.2 gr de levadura y 1% de sales inorgánicas (solución madre: 2,03 g / litro de MgCl₂, 1,02 g / litro de CaCl₂ y 0,1 g / litro de MnCl₂). Llevándolo a gran escala y a condiciones de pH 7.2 y temperatura de 32°C, obteniendo como resultado 1487 (unidades tóxicas internacionales) IU/mg que es equivalente a 8 643 917 IU/ ml, demostrando con la producción en masa que el SMS es un sustrato rentable potencial para el cultivo de *Bt*.

ZABALETA, Gina. en su tesis “*Evaluación de la capacidad biocida de Bacillus thuringiensis h-14 var. israelensis cultivado en sanguaza sobre larvas de Aedes aegypti en el distrito de Laredo la Libertad – Perú, 2010*”, elaboró un bioinsecticida usando la sanguaza como sustrato para la bacteria, esta fue recogida de las industrias de harina de pescado del puerto “Malabrigo”, y en el Laboratorio de Microbiología determinaron su estructura química y conservó por helamiento (-20 °C) por un tiempo aproximado de 5 días; posteriormente se preparó en base a un medio de producción en el que se agregó sanguaza en sustitución de la fuente nitrogenada, la cual diluyeron a 10% v/v , con un pH de 7.0 con NaOH 1 N, y el medio esterilizado en autoclave (121°C/1 atm/15 min.), se inoculó la *Bacillus thuringiensis* a 170 ml de la suspensión estándar, en el biorreactor, luego se llevaron a agitación y aireación constante durante 48 horas a temperatura de (30°C). Donde concluyeron que el bioinsecticida conseguido usando sanguaza muestra una alta capacidad biocida, con un 100% de mortalidad larval de *A. aegypti* en condiciones de laboratorio y en campo simulado en 24 horas.

Asi mismo los cultivos extensivos para controlar las plagas como los lepidópteros usan insecticidas químicos, causando peligros ambientales por ello la *Bacillus thuringiensis* es una alternativa ya que tiene un espectro particular de toxicidad para un rango de insectos (Sauka y Benitende, 2017, p. 274), además, se encuentra en el suelo, polvo almacenado y las hábitas de insectos.

Para eso es necesario tener conocimiento de sus características para tomar las decisiones adecuadas con respecto a su manejo y condiciones a someter; pues la *Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram positivo, por lo que según (Mora,2012, p.26) la tinción gram es un tipo de tinción que permite diferenciar las bacterias según sus características morfológicas, los fundamentos de la diferenciación son que la tinción gram positivo tiene un componente que es el peptidoglucano que constituye la pared celular formando una gruesa capa, mientras que la tinción gram negativo contiene una capa delgada. Cuyo tamaño oscila entre 1 a 1.2 micrómetros de ancho y de 3 a 5 micrómetros de largo (Portela, Chaparro y López, 2013, p. 88). Con respecto a su alimentación puede degradar la glucosa, fructosa, trealosa, maltosa y ribosa, usándola como su fuente de carbono y de hidrolizar gelatina, glucógeno, esculina y N-acetil-glucosamina como su fuente de nitrógeno. Estos nutrientes generan el crecimiento de la bacteria y la producción de las proteínas denominadas Cry (del inglés, Crystal), que surgen del proceso de esporulación (Suka, Benidente,2008, p. 125).

Es por eso que el ciclo de vida de la *Bacillus thuringiensis* está marcado por dos procesos simultáneos, siendo el primer proceso las etapas de desarrollo de la bacteria, donde necesita de ciertas condiciones óptimas para su adecuado desarrollo; y de acuerdo a antecedentes rescatan a la temperatura como un factor principal, mencionando que la adecuada está en un rango de 26 y 30°C y a un pH neutro, pero, BUITRAGO (citado en Portela, Chaparro y López, 2013, p. 90-91) nos menciona que las condiciones necesarias son una temperatura entre 27-35°C y un pH de 6.8 a 7.2; sin embargo, Vargas Franklin et. al (2001) obtuvo como resultado que a un pH 9 un mejor crecimiento de la *Bacillus thuringiensis H-14 Var Israelensis* (p.2); teniendo así dos rangos que se requiere más pruebas para determinar el ideal.

El proceso inicia con la germinación de esporas donde las células expresan enzimas extracelulares, le sigue la etapa de crecimiento donde la bacteria se multiplica aprovechando los nutrientes disponibles, como tercera etapa tenemos la transición de la fase vegetativa a la fase de esporulación, como reacción a la disminución de nutrientes haciendo que el modelo de genes cambie para afrontar un medio adverso, esta acción se debe a las proteasas extracelulares y por último tenemos la etapa de esporulación, este es el otro proceso, que consiste en la creación de esporas y síntesis de los cristales parasporales, denominados Cry, en esta fase la célula es denominada esporangio y está compuesta de dos compartimentos: la célula madre y preespora, que durante el proceso de maduración se envuelve de dos capas, el córtex al interior y la cubierta

al exterior; el ciclo termina con la fase lítica, donde el cristal ubicado en el interior del esporangio y fuera del exosporio de la espora son liberados (Realpe., Montoya, y Orduz, 1998, p. 15).

Pero la producción de la endotoxina con lleva otro subproceso más complejo y que depende de ciertos factores.

La endotoxina Cry es la causante de la toxicidad de la *B. thuringiensis*, denominada también como cuerpo parasporal o cristal proteico, como ya antes se había mencionado se produce en la etapa de esporulación, alcanzando su nivel máximo de biosíntesis entre 4 y 8 horas (Realpe., Montoya, y Orduz, 1998, p. 17). Su principal ventaja es ser altamente específica para los insectos, siendo inofensivos para los humanos, vertebrados y las plantas, además de ser completamente biodegradables (Bravo, 2017, p. 98).

Su proceso de producción inicia justo cuando la célula bacteriana, denominada esporangio, termina su fase vegetativa conteniendo dos cromosomas, las cuales se condensan y se da la formación de filamentos axiales, que no son más que flagelos, luego sigue con la formación de la pared de la preespora genera dos secciones donde se separa el DNA, el de la espora y el de la célula madre. Como tercera fase tenemos el proceso de cubrimiento con la intervención de los mesosomas, donde se da la primera aparición de la inclusión ovoide, es decir la capa de la célula madre crece hasta formarse con la capa del esporangio y quedar libre en el citoplasma, también tenemos la aparición del cristal parasporal y la generación de la preespora.(Hernández,2014, p.7)

Las siguientes fases (IV al VI) es la formación del exosporio, pared celular, corteza y cubiertas de la espora acompañado de la evolución del nucleoide de la espora. Finalmente, en la etapa VII se da la maduración de las esporas, la endotoxina Cry se sitúa dentro del esporangio y al ultimar el proceso de maduración de esporas son expuestos al medio de cultivo (Hernández, 2014, p. 7).

Estas endotoxinas se encuentran en estado inactivo, pero, al ser ingeridas por los insectos, su capa protectora se solubiliza, esto es debido al pH alcalino del sistema digestivo del insecto. Por consiguiente, la endotoxina se activa atrayendo a receptores, que al unirse con esta genera poros en la membrana del sistema digestivo del insecto, permitiendo el paso de iones (Soberón et al. 2017, p.304) (Suzanne et al. 2001, p. 70) (Hussain et al. 2011, p. 145).; como: K, dándose así

una descompensación osmótica y luego la muerte (Castañet y Moreno, 2016, p. 38) (Portela, Chaparro y López, 2013, p. 89)

Pero la actividad tóxica depende de su composición, la cual puede variar, es decir que actúan específicamente contra ciertas especies de insectos, entre las cuáles tenemos que según su toxicidad es dual, tanto para larvas de lepidópteros y coleópteros. Teniendo que su composición proteica depende del contenido del medio de cultivo y de las condiciones de crecimiento utilizadas. Por ello pueden generar ciertos factores limitantes que afecten la producción de endotoxina Cry (Hernández, 2014, p.2-16).

Las proteasas extracelulares cabe resaltar, son las que se presentan en mayor volumen según Papagianni (2017) quien también las denomina como enzimas microbianas, las cuales se secretan de forma logarítmica en la etapa de crecimiento, estas enzimas son un elemento clave para la formación de endotoxina Cry, pues entre sus funciones tenemos el recambio de proteínas, que se da en la etapa de transición, donde la célula se adapta a las nuevas condiciones del medio y como respuesta se da la formación de la endotoxina (Ferrero, 1995, p. 6-10).

Otra de sus funciones es sintetizar los nutrientes en el medio de cultivo para usarlo como fuente de nitrógeno y aminoácidos, y puedan ser absorbidas por la bacteria (Ferrero, 1995, p. 8); estos nutrientes son necesarios para formar la espora y cristal proteico, por lo que su actividad afecta a la virulencia y capa de las esporas.

Por esos motivos se le considera un factor de suma importancia y su producción en la fase de crecimiento se encuentran fuertemente influenciado por la composición del medio de cultivo, así como la relación de Carbono/Nitrógeno, los iones metálicos, azúcares, temperatura, fuerza iónica y pH, debido a que son liberadas al medio de crecimiento de la bacteria (Brar, et al, 2007, p.774).

Parámetros físicos, investigaciones como las de Hernández, Christian (2014) mencionan que los factores que debemos tener en cuenta son los siguientes: La oxigenación, que en condiciones de saturación de oxígeno las densidades celulares aumentan, pues la asimilación de nutrientes es mejor, sin embargo los rendimientos de obtención de proteínas Cry disminuyen, ya que no se da ese medio adverso que favorece a la esporulación, y por otro lado se ha observado que la generación de endotoxina es mayor y con cristales de mayor dimensión a niveles bajos de aireación (1:1.5 aire-medio) (p.28), sin embargo López Ruth (2009) realizó una comparación

sobre la producción de esporas por *Bacillus thuringiensis* limitando y no limitando el oxígeno, concluyendo que con un nivel bajo de oxígeno la producción de esporas disminuye en un 92% (p.1); a esta investigación la refuerza la hecha por Fernández Orietta (2009) , que trabajo a una escala de 100 L encontrando una concentración final de esporas y cristales por ml ($2.7 \cdot 10^9$ células por ml) a 300 rpm y 1 vvm (p.206).

Otro factor es el pH, es necesario tener al medio de cultivo a un pH inicial de 6,8-7,2, pues en la tesis realizada por Hernández (2014) demostró que a este rango la acción de las proteasas es mayor, pero a un pH 9,0 influye en el crecimiento de la bacteria de manera negativa (p.26). Fernández (2009) menciona que estos resultados pueden variar de acuerdo a la composición del medio, pero si los nutrientes están bien balanceados, los resultados deben ser similares (p.207).

La temperatura tiene diferentes efectos tanto en la etapa de desarrollo de la *Bacillus thuringiensis* y en la etapa de transición, Lázaro (1997) menciona que en la etapa de desarrollo una temperatura menor a la óptima produce un retardo en el crecimiento y la disminución de la producción celular, así como también una temperatura superior a la óptima produce choque térmico, llevándolos a una respuesta de estrés celular, pero con una mayor producción de proteasas celulares y reducción de los productos proteicos (p.3-4), siendo en este caso la endotoxina Cry. En cambio, en la etapa de transición las endotoxinas se ven afectadas por la alta temperatura, pues sometiéndolas a 50°C reduce su actividad biocida en un 70% (Arrivillaga y Ochoa, 2009, p.186)

Los nutrientes, para la producción de endotoxina Cry el medio de cultivo debe de contar con carbono para la suministración de energía en el proceso anabólico, nitrógeno para el desarrollo y esporulación con la síntesis de proteína, estas fuentes juegan un papel importante, puesto que su disminución en el proceso da inicio a la etapa de esporulación. Además, contener micronutrientes como Ca, importante para la formación de la pared de la espora, especialmente para resistencia al calor y los rayos ultravioleta; Mg, que junto con el fósforo intervienen en la transferencia de energía; Mn, es esencial para la formación de endoesporas en las distintas especies de *Bacillus*; K y Fe, minerales que su ausencia puede limitar el crecimiento; (Ertola, 1985; Wakisaka [et al], 1982; Harwood, 1989; citados en Beltrán [et. al],1998, p.29).

La proporción adecuada de cada nutriente de acuerdo con la referencia de un medio de cultivo artificial es: glucosa 5 g/L, peptona 5 g/L, NaCl 5 g/L, carne 3 g/L, extracto de levadura 0,5 g/L, MgCl₂ 0,203 g/L, CaCl₂ 0,102 g/L, MnCl₂ 0,01 g/L (Subbiah y Chinnasamy, 2015, p. 295); estos valores son importantes, puesto que el exceso de uno de estos nutrientes puede generar represión catabólica, es decir reducción de la producción de enzimas que degradan los azúcares, en este caso las proteasas.

Estas dietas artificiales generan un alto costo en la producción de la *Bacillus thuringiensis* comprendiendo el 70% del total de toda la producción, siendo así poco viable esta alternativa para una futura comercialización (Subbiah y Chinnasamy, 2015, p. 293), es por eso que se buscan alternativas que reemplacen el medio de cultivo, especialmente aquellas que se aplique la economía circular, para ello se han evaluado distintos tipos de residuos con un alto valor nutricional, y se preste para el desarrollo de la bacteria, una de ellas es la sanguaza, denominada en la industria pesquera como agua de bombeo, es aquella que contiene residuos orgánicos como restos de pescado y sangre que debe ser removida antes de descargarla al mar. Así mismo tiene un alto contenido en grasas que contaminan el mar al no ser tratados, generando un gran impacto en el medio ambiente.

Teniendo un alto valor nutricional, pues contiene 6% de proteínas, 3,1% de grasas, 10.8% de sólidos, 2.3% de sales minerales y 88 % otros (Zabaleta, 2010, p.73), lo que permite aprovecharlo como sustrato para una bacteria. Así mismo es una gran fuente orgánica de nitrógeno, por lo que a partir de ello se puede producir un biopesticida, y si queremos comparar con la eficiencia de un pesticida químico, esta sus efectos se estiman de manera ambigua, ya que con un uso adecuado estos compuestos pueden generar un efecto positivo, mientras que a volúmenes alto los cambios ambientales son significativos (Patyka, 2016, p. 314). Otra desventaja respecto a los pesticidas químicos problemas de contaminación son más perjudiciales ya que ocasionan un desequilibrio en los ecosistemas, pérdidas de cultivo, pérdida de especies silvestres, gastos para reducir los costos de daños ambientales (Pimentel, 2005, p. 229). Ante ello la utilización de restos orgánicos son una alternativa para producir pesticidas naturales ya que los costos son bajos, el consumo de energía es menor y la generación de efluentes es menor, tales como residuos de alimentos, restos de plantas, restos de animales, etc (Sellamuto, 2017, p. 47).

Ante esta exposición de factores que tiene el desarrollo de la *Bacillus thuringiensis* y posibles alternativas de medio de cultivo para la producción de biopesticida surge la pregunta ¿Cuál es el efecto del pH y temperatura en sanguaza para la producción de endotoxina Cry de *Bacillus thuringiensis* como biopesticida?

Pues la creciente generación de desechos y sanguaza se convierte en una alternativa para usarlas como materia prima. Por lo que persigue usar los residuos orgánicos como sustrato para el crecimiento de la bacteria *Bacillus thuringiensis* para la formación de la toxina Cry. La cual servirá como un agente biológico para el control de insectos y plagas de manera eficiente. La presencia de residuos industriales como la sanguaza pueden generar daños al medio ambiente y a la salud de las personas, ya que estos residuos contienen sangre, escamas, grasas y restos de animales, que al llegar al mar provocan cambios en la salinidad, baja del oxígeno disuelto y aumento de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) incrementando los nutrientes, lo cual lleva a una eutroficación, por lo que evita la oxigenación del fondo marino.

Para ello hoy en día una alternativa es poder utilizar estos residuos para la elaboración de subproductos como los biopesticidas ya que se obtienen de fuentes biológicas como macroorganismos, plantas y animales. Desde hace muchos años el uso de biopesticidas genera grandes beneficios a los agricultores ya que al obtenerse de restos orgánicos genera beneficios a la planta y al suelo, y sobre todo las principales ventajas que tiene son mayor eficiencia a una dosis baja, la biodegradabilidad y baja toxicidad a comparación con los pesticidas químicos.

Por lo que nuestra hipótesis sería el efecto del pH y temperatura en sanguaza es significativo para la producción de endotoxina Cry de *Bacillus thuringiensis* como biopesticida, y nuestra hipótesis nula sería el efecto del pH y temperatura en sanguaza no es significativo para la producción de endotoxina Cry de *Bacillus thuringiensis* como biopesticida.

Ante ello nuestro objetivo principal es establecer el efecto del pH y temperatura en sanguaza para la producción de endotoxina Cry de *Bacillus thuringiensis* como biopesticida. Y nuestros objetivos específicos son determinar la mejor temperatura en la producción de la endotoxina Cry, determinar el pH adecuado para la producción de la endotoxina Cry y evaluar el rendimiento de producción de la endotoxina Cry a partir la *Bacillus thuringiensis* usando como sustrato la sanguaza, así como su efectividad.

II. MÉTODO

2.1 Tipo y diseño de investigación

El tipo de investigación es explicativa, debido a que se evaluará como afecta las variables independientes en la dependiente y medir en qué grado varía en el resultado (Hernández, Fernández y Baptista, 1997, p. 74) y el diseño de investigación es experimental pues se manipulara dos variables independientes en condiciones controladas (Tam, 2008, p. 149).

Teniendo un diseño experimental factorial, tomando en cuenta tres temperaturas, y dos pH a manejar en el proceso de fermentación, lo cual nos da un diseño bifactorial de (3x2), obteniendo 6 experimentos y 3 repeticiones por experimento dando un total de 18 experimentos con 6 grupos (G).

Tabla 1. *Distribución de Variables según diseño factorial*

Variables	(T1) 25°C	(T2) 35°C	(T3) 45°C	Total combinado
6 (X1)	X1 /T1	X1 /T2	X1 /T3	3(X1)
8 (X2)	X2 /T1	X2 /T2	X3 /T3	3(X2)
Total combinado	2(T1)	2(T2)	2 (T3)	3x2

Fuente: Elaboración propia

Donde:

(T1) = Temperatura 25°C

(T2) = Temperatura 35°C

(T3) = Temperatura 45°C

(X1) = pH 6

(X2) = pH 8

Variables constantes:

Velocidad de Agitación: 300 rpm

Aireación: 1 vvm

Tiempo: 24 horas

Volumen de sanguaza: 500 ml

2.2 Operacionalización de variables

Variable dependiente

Nuestra variable dependiente es la producción de endotoxina Cry

Variable independiente

En esta investigación se manejarán dos variables independientes: La Temperatura en tres grados distintos: 25°C, 35°C y 45°C y el pH en dos medidas de acidez: 6 y 8.

Tabla 3. *Operacionalización de Variables*

Variables		Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicadores	Instrumento Que Se Evaluará	Escala De Medición
Variable Independiente	Temperatura	Es aquella que mejora la velocidad de crecimiento de un microorganismo, por lo que genera una mayor producción de esporas y densidad celular (BALLARDO, Cindy-2017).	La temperatura se mantendrá constante en una incubadora Kyntel modelo "HHA-10"	Grados Centígrados (°C)	Ficha de recolección de datos	De intervalo
	pH	Generalmente se regula durante el proceso de fermentación de la bacteria para reducir los riesgos de muerte (BALLARDO, Cindy-2017).	El pH se adecuará con NaOH para subir a pH 8 y HCl para disminuir a pH 6. Se monitoreará con un equipo de pH metro modelo "P380-Voeco".	Unidad de pH		
Variable Dependiente	Producción De La Endotoxina Cry	Según ZABALETA, G-2010 Es aquella que se genera en el desarrollo de la bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i> .	Se contabilizará la cantidad de toxinas Cry producidas por la <i>Bacillus thuringiensis</i> en el sustrato (sanguaza) utilizando la cámara Neubauer.	UE/ml (Unidad de endotoxina)	Ficha de recolección de datos	De Intervalo

Fuente: Elaboración propia

2.3 Población, muestra y muestreo

2.3.1 Población

La población estuvo compuesta por la sanguaza proveniente de la etapa de bombeo de la Industria pesquera EXALMAR S.A.A.

2.3.2 Muestra

La muestra fue de 10 litros proveniente de la etapa de bombeo de la industria pesquera, la cual se tomó en un periodo de temporada de pesca y se trabajó a nivel laboratorio.

2.3.3 Unidad de análisis

La unidad de análisis fue de 500ml de sanguaza por cada tratamiento.

2.3.4 Muestreo

La técnica de muestreo es no probabilística y por conveniencia, pues la selección de la muestra fue de acuerdo a nuestros criterios debido a la accesibilidad (Otzen y Manterola, 2017, p. 229-230).

2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad

2.4.1 Validez y confiabilidad de las técnicas de recolección de datos

Con respecto a la toma de datos in situ se cumplió con lo establecido por el Protocolo de Monitoreo de Efluentes de los Establecimientos Industriales Pesqueros de Consumo Humano Directo e Indirecto para la recolección de muestra.

Por otro lado, la ficha técnica a usar para el registro de datos en el proceso experimental fue validada por tres especialistas en el tema.

2.4.2 Validez y confiabilidad de instrumentos de Recolección de datos

La validez de los instrumentos a usar en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad César Vallejo se verificó con el certificado de calibración, demostrando así la confiabilidad en los resultados obtenidos.

2.5 Procedimiento

- Ensamblaje de biorreactor

Se trabajó con un total de 4 biorreactores airlift, uno de capacidad de 5 litros para la preparación de medio de cultivo (2000 ml de medio con sanguaza), y se elaboró tres biorreactores de capacidad de 1L, estos últimos son para someter a la bacteria a las condiciones de estrés previamente establecidas (pH y temperatura), los minibiorreactores se adecuó a las condiciones de velocidad de agitación con asas

internas y las condiciones de aireación por medio de una bomba, la cual pasa por una solución salina estéril al 30% para su purificación (Zabaleta, 2010, p. 23).

- **Recolección de la muestra**

La sanguaza fue recolecta de la industria pesquera “EXALMAR S.A.A.” ubicada en la provincia de Ascope distrito de Chicama, siguiendo el Protocolo de Monitoreo de Efluentes de los Establecimientos Industriales Pesqueros de Consumo Humano Directo e Indirecto, y posteriormente fue trasladada al laboratorio de Biotecnología de la Universidad César Vallejo de Trujillo.

- **Obtención del microorganismo**

La cepa de *Bacillus thuringiensis* se obtuvo del laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo.

- **Reconstitución de la cepa *Bacillus thuringiensis***

Se realizó la activación de la bacteria *Bacillus thuringiensis* mediante el sembrado por el método de estría en una placa Petri, con medio de cultivo Agar y se incubó por 48 horas a 30°C (Ballardos, 2019, p. 34)

- **Prueba de identificación para *Bacillus thuringiensis***

La presencia de inclusiones parasporales fue un indicador fundamental para comprobar si se trata de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, para ello se aplicó una tinción selectiva verde malaquita en una película de la colonia *Bt* sobre una lámina portaobjeto y se observó en microscopio la presencia de esporas y cristales verificando así la originalidad del microorganismo (Aquiahuatl y Pérez, 2004, p. 31).

- **Preparación del medio de cultivo**

En el biorreactor de 5 L se preparó 2000ml de medio fermentativo, compuesto por sanguaza como fuente de nitrógeno y una cantidad de almidón como fuente de carbono (Anexo N°6).

- **Estandarización del inóculo**

Se tomó una alícuota y se agregó una solución salina fisiológica estéril y se estandarizó hasta el tubo N° 3 (9×10^8 cél/ mL.) del Nefelómetro de Mac Farland (Zabaleta, 2010, p. 24). Y al biorreactor de 5L. se añadió el 10%, tomando como referencia a Ballardos en su investigación Wasman, aplicando una relación de 1ml de inóculo para cada 100 ml de volumen.

- **Condiciones del medio de cultivo**

Se adecuó el pH con NaOH 1N a pH neutro y la temperatura a 30°C en una incubadora, por 48 horas. Los recipientes usados previamente fueron esterilizados en la autoclave durante 15 min a 120°C, (Zabaleta, 2010, p. 24).

- Producción de endotoxina Cry (Biorreactores de 1L)

Pasadas las 48 h, se procedió a dividir 500ml para cada biorreactor de capacidad de 1L, en esta etapa se procedió con los tratamientos respectivos, estresando a la bacteria variando el pH y temperatura.

- Condiciones de estrés

El pH fue monitoreado cada cierto intervalo de tiempo, añadiendo la solución de NaOH 1N cuando el pH variaba con el fin de mantenerlo constante.

La temperatura se mantuvo constante en la incubadora, regulando la temperatura deseada para cada tratamiento.

- Recuento de células y esporas

A las 24 h se tomó una muestra de 1000 ul del medio fermentativo, se realizó una dilución hasta 10^{-1} , luego se procedió a tomar 10 ul y se colocó en cámara neubauer, se observó en microscopio a 40 X para realizar el conteo respectivo de cuántos microorganismos esporularon.

- Recuento de endotoxina Cry

Se aplicó dos métodos: directo e indirecto, el directo a través de la tinción con verde de malaquita, donde se observó la presencia de esporas y cristales; el indirecto fue basado en que desde el instante que ocurre el englobamiento de la pre-espora hasta su maduración, en paralelo se da también la formación de cristales parasporales (Benintende y Sauka, 2008, p.125); es decir por la cantidad de esporas es análogo a la cantidad de proteínas.

- Bioensayo en laboratorio

Se recolectó un total de 15 larvas Barrenadoras provenientes de sembríos de maíz, las cuales se clasificaron en 3 tamaños distintos, se repartieron en 3 vasos de tekpor, 5 larvas por cada tamaño, y se procedió a rosear en su alimento (panca de choclo) el biopesticida producido por el mejor tratamiento (concentración de $496 \cdot 10^6$ UE/ml).

2.6 Método de análisis de datos

Los datos Obtenidos fueron procesados y desarrollados con un método estadístico ANOVA usando el programa de análisis estadístico SPSS. El ANOVA permitirá realizar las comparaciones de las diferentes concentraciones, para el análisis de las varianzas con la finalidad de determinar si una difiere de la otra, para comparar la hipótesis nula que tiene medias iguales con la hipótesis alternativa en el cual debe ser diferente al menos en un valor. Así mismo se aplicó la función TUKEY, el cual dio a conocer el mejor tratamiento.

2.7 Aspectos éticos

Los principios éticos aplicados a la Investigación se centraron principalmente en la veracidad de los resultados sin alteración de datos, así mismo citando en todo momento conceptos y procedimientos extraídos de investigaciones y trabajos previos en el sistema ISO 690, respeto por el medio ambiente y recursos naturales (Suelo, agua y/o aire) tanto en el momento de toma de muestras y realización experimental; y sobre todo el respeto a la normativa y política de la Universidad César Vallejo.

III. RESULTADOS

Según los antecedentes debemos empezar con determinar la composición de la muestra de sanguaza para conocer su contenido proteico, ya que este influye directamente en el proceso de desarrollo de la endotoxina cry. Es por ello que se realizó el respectivo análisis físico químico, en el Anexo N°9.

Los siguientes resultados obtenidos de los tratamientos de las muestras producto del cruce de variables manipuladas como la Temperatura y el pH. Así mismo como el análisis estadístico.

Tabla 4. *Producción De Endotoxina Cry*

TEMPERATURA (°C)	(UE/ml)*10 ⁶	
	pH 6	pH 8
25	42.6	6.83
35	497.3	17.8
45	3.83	15.1

Fuente: Elaboración Propia

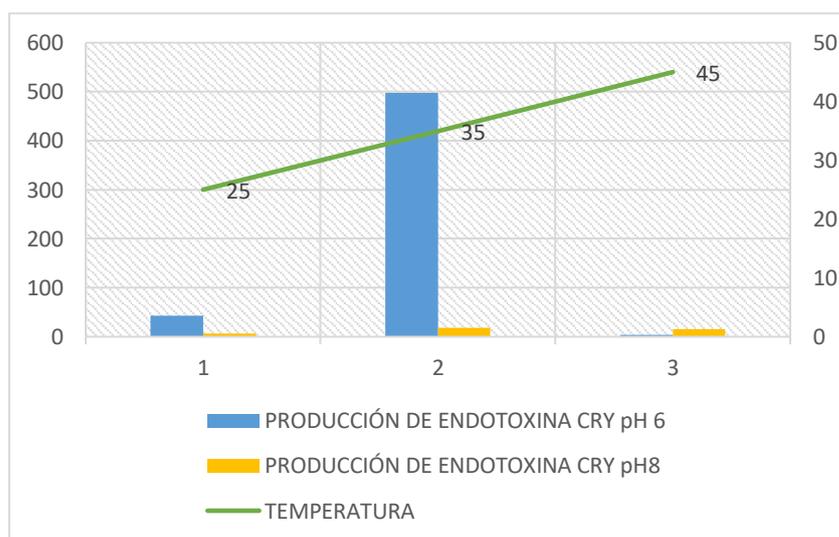


Imagen N°1: Influencia del pH y temperatura en la producción de endotoxina Cry.

En la imagen N°1 se observa la producción de endotoxina Cry respecto a la temperatura y el pH, donde a temperaturas mayores de 35°C en un intervalo de 10°C afecta negativamente a la producción, y en un intervalo menor la producción.

Análisis estadístico del Efecto del pH y temperatura en sanguaza para la producción de endotoxina Cry de *Bacillus thuringiensis* como biopesticida.

- Comprobación de los supuestos

- Pruebas de normalidad para el factor pH

En esta prueba de normalidad se consideró Shapiro-Wilk ya que teníamos 18 resultados, así mismo se confirmó con un 95% de confiabilidad que el $P > 0.05$ en la variable del pH, es decir que siguen una distribución normal, como se puede verificar en el Anexo N°13.

- Pruebas de normalidad para el factor temperatura

Para la variable de temperatura igual al anterior se consideró Shapiro-Wilk, se pudo observar que los datos de temperatura tienen un 95% de confiabilidad a un $P > 0.05$ en las tres temperaturas por lo que podemos decir que siguen una distribución normal, como se puede verificar en el Anexo N°14.

- Prueba de Homogeneidad de varianza

Para esta prueba la producción de endotoxina se basa en la mediana ya que nuestros datos son extremos, y como vemos el $P > 0.05$ con un 95% de confiabilidad por lo tanto podemos decir que son homogéneos, según Anexo N°15.

- Anova

Tabla 5. Prueba de Efecto inter-sujeto

Origen	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	5	115795,522	858,274	,000
Intersección	1	170333,389	1262,508	,000
temperatura	2	115989,264	859,710	,000
pH	1	127008,000	941,381	,000
temperatura * pH	2	109995,542	815,285	,000
Error	12	134,917		
Total	18			
Total corregido	17			

Fuente: Elaboración Propia

En este test se contrasta hasta qué punto los distintos niveles de las variables independientes (pH y temperatura) tienen una variancia homogénea en la variable dependiente (producción de endotoxina Cry), apreciando así en la columna de significancia un error menor a 0.1 % ($p < 0.001$), por lo que se determina con un 99% de confiabilidad que las variables tienen un efecto significativo, tanto para pH como temperatura, rechazando así la hipótesis nula y aceptando la hipótesis alternativa.

Posteriormente a esta prueba (ANOVA) se realizó una prueba post hoc de acuerdo a la prueba Tukey para ver en qué grupos es donde existe diferencia de las medias y se discernió el mejor tratamiento.

- Prueba post hoc

Prueba post hoc para la variable temperatura

En esta prueba se demostró que la temperatura de 35°C generó un mayor promedio de producción de endotoxina Cry, mientras los que tienen menor promedio son a 45°C, además podemos observar la desviación de los diferentes grupos no existen casos extremos.

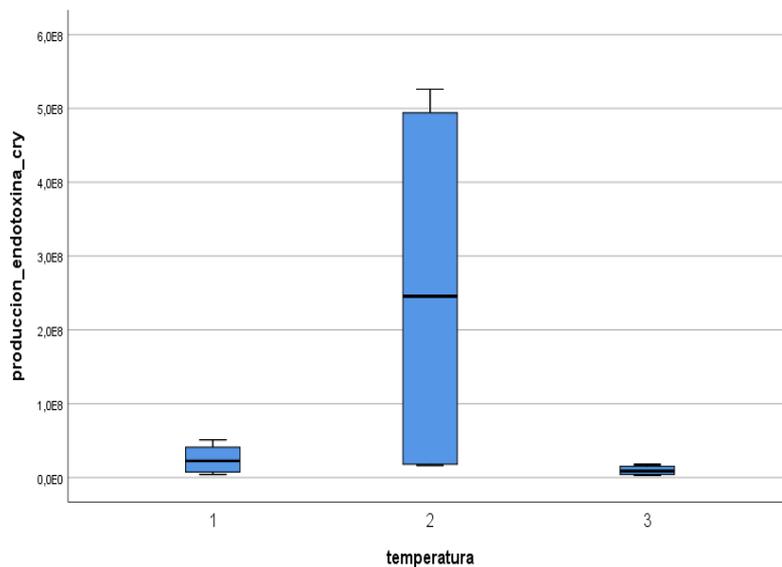


Figura N° 3: Medidas marginales de producción de endotoxina Cry (Temperatura)

Prueba post hoc para la variable pH

Se puede observar que hubo una mayor producción de endotoxina Cry utilizando el pH:6 a una temperatura de 35°C.

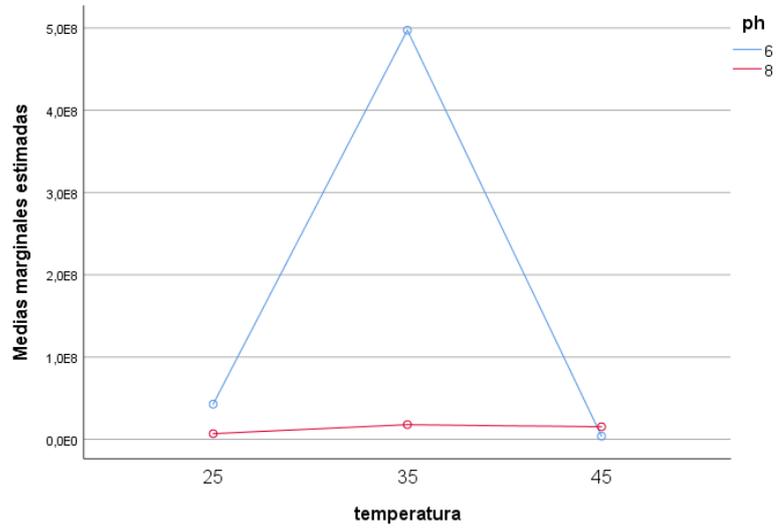


Figura N° 4: Medidas marginales de producción de endotoxina Cry (pH)

IV. DISCUSIÓN

A partir de los resultados de las características físico-químicas de la muestra estudiada de sanguaza (Anexo N° 09), se verifica que es un medio que presta las condiciones para el desarrollo de *Bacillus thuringiensis*, ya que con respecto a su alimentación puede degradar la glucosa, fructosa, trealosa, maltosa y ribosa, usándola como su fuente de carbono y de hidrolizar gelatina, almidón, glucógeno, esculina y N-acetil-glucosamina como su fuente de nitrógeno, tal como lo menciona SAUKA, Diego y BENINTENDE, Graciela (2008). Estos nutrientes generan el crecimiento de la bacteria y la producción de las proteínas denominadas Cry que surgen como su protección ante un medio desfavorable.

Además, los valores de la composición que muestra la sanguaza son similares a los mencionados por PAKITA (2016), caracterizando a la sanguaza como un residuo con alto valor nutricional; sin embargo, los nutrientes que requiere la bacteria y las cantidades adecuadas que menciona SUBBIAH, Poopathi y CHINNASAMY, Mani (2015) basándose en un medio artificial, se evalúa que la sanguaza presenta concentraciones nutricionales muy elevadas, y para trabajarlo de manera similar a un medio artificial, con la finalidad de seguir estándar a nivel industrial, fue necesario diluir para evitar saturar a la bacteria de nutrientes así como lo realiza ZABALETA, Gina (2010) en la producción de un insecticida en sanguaza.

Otro aspecto a tener en cuenta son las condiciones de producción, siendo el pH y la temperatura los factores evaluados en dos y tres niveles respectivamente; en la Tabla N°03 “Producción de Endotoxina Cry” se muestran los resultados obtenidos a distintas condiciones, pH (6 y 8) y temperatura (25 °C, 35° C y 45° C), los cuales al analizarlos con las pruebas estadísticas primero se determinó su normalidad para así luego poder aplicar el método ANOVA, en la Tabla N°6 “Prueba de normalidad con relación al pH”, la Tabla N° 7 “Prueba de normalidad con relación a la temperatura” y la tabla N° 8 “Prueba de igualdad de Levene de varianzas” se comprueba que nuestros datos tienen una distribución normal y por ende se realizó la prueba ANOVA, la cual en la Tabla N°09 “Pruebas de efecto inter sujeto” nos muestra que existe un efecto significativo en la producción de endotoxina Cry por ambas variables, tanto individualmente como combinadas. HERNÁNDEZ Cristian (2014) y ZABALETA Gina (2010), reafirma lo antes mencionando, pues en sus investigaciones mencionan que estos parámetros son

muy importantes, pues la producción de endotoxina Cry se da como reacción a un cambio en las condiciones de desarrollo de la *Bacillus thuringiensis*, así como se realizó en los tratamientos.

Referente al efecto del pH, en los distintos tratamientos en sanguaza a un pH 8 se observó en los resultados que la producción de endotoxina Cry fue mínima en todas las temperaturas, apreciándose esto en la Figura N° 02 “Producción de endotoxina Cry con respecto al pH”. Resultados similares obtuvo HERNÁNDEZ, Cristian (2014) determinando que a un pH 9 afecta de manera negativa en el crecimiento de la *Bacillus thuringiensis*. Esto nos demuestra que el cambio de pH afectó a las proteasas las cuales se encargan de la lisis de los nutrientes para el crecimiento de la bacteria y del recambio de proteínas para la formación del cristal en la etapa de transición, como lo menciona FERRERO Marcelo (1994).

Asimismo, de acuerdo con la literatura presente se puede afirmar que la *Bacillus thuringiensis* tiene distintos pH adecuados para la producción de endotoxina Cry como biopesticida los cuales van a depender mucho de la composición del medio, pues VARGAS, Franklin (2001) en su investigación con infusión de esparrago determinó que entre pH 7 y 9, el segundo es el más adecuado, concordando así con el autor FERNÁNDEZ, Orietta, afirmando que pueden existir diferencias según la composición del medio de cultivo, pero si ellos están bien balanceados en la composición de nutrientes el pH es similar al obtenido en diferentes experimentos.

Por otro lado, la temperatura es otro factor importante, autores como BUTRIAGO (2004) menciona que el rango de temperatura adecuado para el desarrollo de la *Bacillus thuringiensis* está entre 27 - 35 °C y estudios anteriormente mencionados trabajan a una temperatura de 30 °C durante todo el proceso de sus tratamientos, sin embargo en esta investigación se diferenció dos etapas de desarrollo de la *Bacillus thuringiensis*, la etapa exponencial la cual se trabajó a 30°C, y justamente para llegar a la etapa de esporulación se modificó a tres niveles; esto con el fin de obtener una mayor población bacteriana y luego una mayor cantidad de endotoxina Cry.

En el Anexo N° 06: Comparación entre tratamientos G1, G2 y G3, se observa que la temperatura 45°C afectó al metabolismo de la bacteria, pues a esta condición la *Bacillus thuringiensis* presentó mayor longitud con respecto a las estresadas a temperatura 25°C y 35°C; incluso a temperatura de 25°C se apreció una disminución de producción de endotoxina Cry, reafirmando lo mencionado por LÁZARO, Ana , donde nos dice que una temperatura menor a la óptima produce un retardo en el crecimiento y la disminución de la producción celular, tal como sucedió a la temperatura de 25°C y a una temperatura superior a la óptima produce choque

térmico, llevándolos a una respuesta de estrés celular, pero con una mayor producción de proteasas celulares y reducción de los productos proteicos, lo sucedido a temperatura de 45°C, donde las proteasas generaron una mayor disponibilidad de nutrientes, generando así un mayor desarrollo y un retardo en la producción de endotoxina Cry; por otro lado, esto nos demuestra que ambos factores a la par generan efecto en la producción de endotoxina Cry, como también se observa en el Tabla N°09 “Prueba de Efecto Inter-sujeto.”

Además, se obtuvo una mayor producción a una temperatura de 35°C tanto en pH 6 como en pH 8, además al aplicar las prueba Post hoc para determinar la mejor temperatura obtenemos el mismo resultado (Imagen N° 3: Medidas marginales de producción de endotoxina Cry (Temperatura)” y Anexo N° 13: “Prueba Post hoc”), es decir si se deseará trabajar con una sola variable la mejor sería temperatura 35°C; pero BALLARDOS, Cindy (2016) en su investigación determina que la *Bacillus thuringiensis* resiste a temperaturas muy por encima de esta, llevándola a desarrollarse hasta 65°C, pero esto es en un medio complejo, pues es a base de residuos orgánicos y la temperatura favorece a la disgregación de las cadenas de azúcares o carbohidratos para el mejor desarrollo de la bacteria, sin embargo, ARRIVILLAGA Jazzmin y OCHOA Gustavo (2009) en su estudio determino que las endotoxinas se ven afectadas por la altas temperaturas, pues sometiéndolas a 50°C redujo su actividad biocida en un 70%, esto nos reafirma que tanto la etapa de desarrollo como la de producción de endotoxina son muy distintas así como también los efectos de los parámetros físicos.

Ahora, en otro orden de ideas al revisar el Anexo N° 14 “Medidas Marginales de Producción de Endotoxina Cry” y al analizar de manera conjunta las variables se aprecia que las mejores condiciones de tratamiento es a 35°C y pH 6, lo cual también se demuestra en el Gráfico N°1 “Influencia del pH y temperatura en la producción de endotoxina Cry.”.

Finalmente de acuerdo a los resultados obtenidos, se suma a lo que anteriores estudios presentados en nuestros antecedentes han demostrado, que los residuos de procedencia orgánica son una alternativa aprovechable para a partir de ello se pueda producir un biopesticida; desde ya con esta investigación se logró producir hasta $497.3 \cdot 10^6$ UE/ml utilizando sanguaza, en cambio CARBALLAR Rebeca (2014) utilizando residuos agroindustriales produjo 8 643 917 UE/ ml, demostrando así que la sanguaza es 60 veces más eficiente, caracterizándolo como un residuo de gran potencial para la producción de biopesticidas, sin embargo se encuentra en desventaja frente al medio usado por FERNÁNDEZ Orietta (2009) compuesto por levadura

torula, harina de soya, almidón y carbonato de calcio, pues produce hasta $1.5 \cdot 10^9$ esporas y cristales/ml, produciendo hasta dos unidades más que en un medio con sanguaza. Muy a pesar de que las composiciones de los medios son muy similares, así mismo como la proporción adecuada de cada nutriente de acuerdo con la referencia de un medio de cultivo artificial: glucosa 5 g/L, peptona 5 g/L, NaCl 5 g/L, carne 3 g/L, extracto de levadura 0,5 g/L, MgCl₂ 0,203 g/L, CaCl₂ 0,102 g/L, MnCl₂ 0,01 g/L; lo cual se puede evidenciar en el Anexo 8.

Por otra parte la levadura torula es un compuesto de mejor calidad, muy utilizado en la industria alimentaria, lo que genera un aumento en el costo de producción de un biopesticida, lo cual desde ya solo la etapa de producción de *Bacillus thuringiensis* representa un 70% del costo total de acuerdo a la investigación realizada por Subbiah y Chinnasamy (2015), por eso ante ello seguimos sosteniendo que la sanguaza en un medio alternativo para la producción de un biopesticida, concordando con la investigación previa de DÍAZ (2003), la cual califica a la sanguaza como un medio para un mayor desarrollo de la *Bacillus thuringiensis*.

Asimismo, el biopesticida producido en sanguaza presenta una efectividad del 100% contra larvas del 1er y 2do estadio de la plaga comúnmente llamada Barrenador, en un tiempo de 24 horas, pero en larvas del 3er estadio presenta una efectividad del 60%, pues presenta una mayor resistencia ante estos biopesticidas.

V. CONCLUSIONES

Las conclusiones que derivan de esta investigación son las siguientes:

- El efecto del pH y temperatura en sanguaza para la producción de endotoxina Cry de *Bacillus thuringiensis* como biopesticida es significativo en un 99% de confiabilidad.
- De los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos de acuerdo a las pruebas Post Hoc se determinó como mejor temperatura a 35°C en la producción de la endotoxina Cry a partir la *Bacillus thuringiensis* usando como sustrato la sanguaza, afirmando la percepción de lo mostrado en nuestra tabla de datos.
- Respecto a nuestra otra variable, se concluye como mejor pH a 6, el cual ayuda de manera más efectiva al recambio de proteínas para la producción de endotoxina Cry.
- Así mismo el mejor rendimiento se obtuvo con el tratamiento de pH: 6 y temperatura de 35°C, produciendo un total de 498.3 UE/ml, siendo el tratamiento efectivo en un 88%.

VI. RECOMENDACIONES

- Continuar con las investigaciones, utilizando otras alternativas, como productos alternativos para la producción de *Bacillus thuringiensis* (Bti), que se encuentre al alcance y que así como la sanguaza se le un valor agregado.
- Potenciar y masificar la aplicación de la *Bacillus thuringiensis* cultivado en sanguaza, por constituir una buena alternativa para controlar específicamente plagas como los lepidópteros de manera efectiva e inocua para la naturaleza.
- Perpetuar la investigación, es decir obtener un producto alternativo a partir de la *bacillus thuringiensis* para la agricultura y que los costos de producción bajos.
- Poder investigar si el metabolismo de la bacteria para conocer que tipo de componentes necesita para crear la endotoxina Cry.
- Realizar pruebas para identificar que tipo de endotoxina cry se produce y así saber exactamente como ataca a las plagas.
- Tener en cuenta otras variables como el tiempo y aireación en futuras investigaciones para probar si generan cambios en la producción de la endotoxina Cry.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABESSA Denis [et al.] Pollution status of marine protected areas worldwide and the consequent toxic effects are unknown. *Environmental Pollution*. [En línea] Vol 243. Diciembre, 2018. [fecha de consulta: 16 de abril 2019] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749118303488> ISSN: 0269-7491
- AQUIAHUATL, María de los Ángeles y Pérez, María. Manual de prácticas de laboratorio de microbiología general. México: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. 2004. 116 pp. ISBN 9703101410
- ARRIVILLAGA, Jazzmin y OCHOA, Gustavo. *Bacillus thuringiensis*: Avances y perspectivas en el control biológico de *Aedes aegypti*. *Bol Mal Salud Amb* [En línea]. Vol.49, n°2, 2009. [citado 2019-12-02], pp. 181-191. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S169046482009000200002&lng=es&nrm=iso. ISSN 1690-4648.
- BALLARDO, Cindy. et.al. A novel strategy for producing compost with enhanced biopesticide properties through solid-state fermentation of biowaste and inoculation with *Bacillus thuringiensis*. *Waste Managemen*. España.2017. [En línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.09.041>. Vol. 70. Diciembre 2017. [Fecha de consulta: 16 de abril de 2019]. ISSN: 0956-053X.
- BRAR, Satinder [et al.]. *Bacillus thuringiensis* proteases: Production and role in growth, sporulation and synergism . *Process Biochemistry* [En línea]. Vol. 42, n° 5, 2007. [fecha de consulta: el 16 de abril del 2019] Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.01.015>. DOI: 10.1016
- BELTRÀN, L et.al. Estrategia para el diseño de un medio de cultivo para la fermentación con *bacillus thuringiensis*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Colombia. 1998. [En línea]. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/29981>. Vol. 1, n°1 [Fecha de consulta: 16 de abril de 2019]. ISSN electrónico: 1909-8758
- BRAVO, Alejandra. Biodiversity of Cry toxins produced by *Bacillus thuringiensis* and evolution of resistance to these toxins in different insect pests. *Toxicon* [En línea]. Vol. 149, 2017. [fecha de consulta: el 30 de abril del 2019] Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.02.010>. ISSN 0041-0101

CABALLAR, Rebeca [et. al]. Use of spent mushroom substrate for production of *Bacillus thuringiensis* by solid-state fermentation. *Journal of Economic Entomology* [En línea]. Vol. 107, n°1, 2014. [fecha de consulta: el 05 de octubre del 2019] Disponible en: <https://doi.org/10.1603/EC13276>. ISSN 0022-0493

CALVO Soanez, Mariano. *Ecología Industrial*. 2ª. ed. México. Editorial Colección. 1998. 105pp. ISBN: 8471147149

CASTAÑET, Camilo y MORENO, Sandra. *Bacillus thuringiensis*: Características y uso en el control de *Aedes aegypti*. *ICIDCA Sobre los derivados de la caña de azúcar* [En línea]. Vol. 50, 2016. [fecha de consulta: el 30 de abril del 2019] Disponible en: <https://www.latindex.org/latindex/ficha?folio=12936>.ISSN 0138-6204

DÍAZ D, F. Influencia de la sangüaza y aireación sobre algunos parámetros cinéticos *Bacillus thuringiensis* durante la producción de bioinsecticida en biorreactor Airlift. Tesis (Grado de Maestro en Biotecnología y Bioingeniería). Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo, 2003.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). Diagnostico sectorial agropecuario pesquero y recursos natrales del estado de Sonora. [en línea]. México, 2010 [Fecha de consulta: 04 de abril de 2019]. Disponible en: https://www.faoevaluacion.org.mx/pagina/documentos/sistemas/eval2014/resultados2014/PDF2/SON/Disgnostico_20_octubre_2010.pdf

FERNÁNDEZ, Orietta, CEJAS, Argelia y MÁRQUEZ, María. Influencia del medio de cultivo, el tipo de inóculo y las condiciones de agitación-aireación en la reproducción de dos cepas de *Bacillus thuringiensis (berl.)* en fermentadores de diferentes volúmenes. *Fitosanidad* [En línea]. Vol. 13, n° 03, 2009. [Fecha de consulta: el 14 de abril del 2019] Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1562-30092009000300008&lng=es&nrm=iso. ISSN 1818-1686

FERRERO, Marcela. Estudios de producción de proteasas en especies del género *Bacillus*. Tesis (Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires). Argentina: Universidad de Buenos Aires, 1995.138 pp. Disponible en: https://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n2745_Ferrero.pdf

HERNÁNDEZ, Cristian. Optimización de las condiciones de cultivo para mejorar el rendimiento de producción y purificación de las proteínas Cry en *Bacillus thuringiensis*. Tesis (Maestro en Ciencias). México: Centro De Investigación Científica Y De Educación

Superior De Ensenada ,2014. 64 pp. Disponible en:
<https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/622/1/235011.pdf>

HERNÁNDEZ, Roberto, Fernández, Carlos y Baptista, Pilar. Metodología de la Investigación. Colombia. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana, 1997. 497pp. ISBN: 968-422-931-3.

HUSSAIN, Syed [et al]. Characterization of a Mutant *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin With Enhanced Stability and Toxicity. *Rev. Colomb. Biotecnol* [En línea]. Vol. 13, n° 2, 2011. [fecha de consulta: el 16 de abril del 2019] Disponible en:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012334752011000200013&lng=en&nrm=iso. ISSN 0123-3475

Resolución Ministerial N° 029-2019-PRODUCE . Diario oficial El Peruano, Lima, Perú, 30 de enero del 2019.

LÓPEZ, Ruth y DE LA TORRE, Mayra. Efecto de la limitación de oxígeno durante la esporulación y expresión de *Cry IA* en *Bacillus thuringiensis*. [En línea]. [Fecha de consulta: el 14 de abril del 2019]. Disponible en:
https://smbb.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_XIV/CXIV-15.pdf.

MORA, Xavier. Diferenciando bacterias Gram+ y Gram-. *Selecciones Avícolas* [En línea]. Vol.54, (2), 2012. [Fecha de consulta: el 14 de abril del 2019] Disponible en:
<https://seleccionesavicolas.com/pdf-files/2012/2/6536-diferenciando-bacterias-gran-y-gram.pdf>. ISSN 0210-0541

MUDDANURU, Tarakeswari, Kumar, Ananda. Development and evaluation of transgenic castor (*Ricinus communis* L.) expressing the insecticidal protein Cry1Aa of *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran insect pests. *Crop Protection*. [En línea]. Vol.119. Mayo 2019 [fecha de consulta: 05 de abril de 2019] Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219419300171>. ISSN: 0261-2194.

MUÑOZ, Hipólito y Baumann, Jürgen. Remoción de bacterias coliformes en un sistema de lodos activados y humedal construido. *Ecosistemas y recursos agropecuarios* [en línea]. 2017, vol.4, n.º11 [fecha de consulta: 25 de abril de 2019], pp.287-297. Disponible en:
<http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_Arttext&pid=S200790282017000200287&lng=es&nrm=iso>. ISSN 2007-901X.

MUÑOZ, J. Contaminación de la bahía de Pisco-Paracas y su impacto ambiental.Tesis (Grado de Ingeniero Sanitario Ambiental).Perú:Universidad Nacional de Ingeniería, 1996.120 pp.

PAREDES Concepción, P. Producción más limpia y el manejo de efluentes en plantas de harina y aceite de pescado. *Industrial Data* [en línea]. Vol.17. n° 2. diciembre 2014 [fecha de consulta: 1 de octubre de 2019] Disponible en: <https://doi.org/10.15381/idata.v17i2.12050> ISSN 1810-9993

PATYKA, Volodymir. Buletsa, N. Pasichnyk, L.. Specifics of pesticides effects on the phytopathogenic bacteria. *Ecological Chemistry and Engineering. Ecological chemistry and engineering*. Vol.23. n.º2. Julio 2016[fecha de consulta: 01 de abril de 2019] Disponible en: <https://content.sciendo.com/view/journals/eces/23/2/article-p311.xml>. ISSN 1898-6196

PAPAGIANNI, Maria. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Bioprocesses, Bioreactors and Controls [En línea]. El Servier, 2017 [fecha de consulta: 06 de mayo del 2019]. Capítulo 3. Microbial Bioprocesses. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63663-8.00003-3>. ISBN 978-0-444-63663-8

PIMENTEL, David. Environmental and Economic Costs of the Application of Pesticides Primarily in the United States. *Environment, Development and Sustainability* [En línea]Vol.7. n.º2 Junio 2005. [fecha de consulta: 16 de abril 2019].Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10668-005-7314-2>. ISSN 1573-2975

PÍREZ, M. y MOTA, M. Morfología y estructura bacteriana. [En línea]. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf> [fecha de consulta: el 16 de abril del 2019]

PORTELA, Diana, CHAPARRO, Alejandro y LÓPEZ, Silvio. La biotecnología de la *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. *NOVA* [En línea]. Vol. 11, n° 20, 2013. [Fecha de consulta: el 14 de abril del 2019] Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S179424702013000200010&lng=en&nrm=iso. ISSN 1794-2470

RAYMOND.F. Oram. Biología, Sistemas biológicos. México. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. 2007. 601 pp. ISBN: 9789701062920.

REALPE, Mauricio; MONTOYA, D. y ORDUZ, Sergio. *Bacillus thuringiensis*: legado para el siglo XXI. *Revista Colombiana de Biotecnología* [En línea], n° 1, 1998. [fecha de consulta: el 15 de abril del 2019] Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/29979/56749>. ISSN 0123-3475

ROBLES Castillo, Heber. Capacidad Degradativa de dos consorcios microbianos del desecho Pesquero Sanguaza Contaminante del Puerto Malabrigo, Perú. Tesis (Doctor en medio ambiente). Universidad Nacional de Trujillo. 2005. 75p.

ROJAS, Marcelo. Tipos de Investigación científica: Una simplificación de la complicada incoherente nomenclatura y clasificación. *REVET* [En línea]. Vol. 16, n°1,2015. [fecha de consulta: el 30 de abril del 2019] Disponible en: <https://www.latindex.org/latindex/ficha?folio=13279>

SAUKA, Diego y BENINTENDE, Graciela. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología* [En línea]. Vol. 40, n°, 2008. [fecha de consulta el 14 de abril del 2019] Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S032575412008000200013&lng=es&nrm=iso .ISSN 0325-7541

SAUKA, Diego y BENINTENDE, Graciela. Diversity and distribution of lepidopteran-specific toxin genes in *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina. *Rev. Argentina de Microbiología* [En línea]. Vol. 49, n°3, 2017. [Fecha de consulta: 06 de mayo del 2019] Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2017.02.003> . ISSN 0325-7541

SELLAMUTU. Balasubramanian y RAJESHWAR, Tyagi. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering [En línea]. Canada. [s.n.], 2017 [Fecha de consulta: 04 de abril de 2019]. Chapter 3. Biopesticide Production from SolidWastes. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/book/9780444636645/current-developments-in-biotechnology-and-bioengineering>. ISBN: 9780444636645. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63664-5.000034>

SAVINI, Vincenzo y Fazii, Paolo. The Diverse faces of *Bacillus cereus* [En línea]. Italia. 2016 [fecha de consulta: 09 de mayo de 2019] Chapter 12 - *Bacillus thuringiensis* Insecticide Properties. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128014745000128>. ISBN: 9780128014745.

SOBERÓN, Mario [et al]. Cell lines as models for the study of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* [En línea]. Vol. 93, 2017. [fecha de consulta: el 30 de abril del 2019] Disponible en: [10.1016/j.ibmb.2017.12.008](https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.12.008). ISSN 0965-1748

SUBBIAH, Poopathi y CHINNASAMY, Mani. Coffee in Health and Disease Prevention [En línea]. Academic Press, 2015 [fecha de consulta: 04 de abril del 2019]. Capítulo 32. Use of Coffee Husk Waste for Production of Biopesticides for Mosquito Control. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00032-2>. ISBN 978-0-12-409517-5

SUZANNE, Arnold [et. al]. The role of a proline-induced broken-helix motif in K-helix 2 of *Bacillus thuringiensis* N-endotoxins. *Letras FEBS* [En línea]. Vol. 492, n° 1.2, 2001. [fecha de consulta: el 16 de abril del 2019] Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02139-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02139-1) ISSN 0014-5793

TAM, Jorge; VERA, Giovanna y OLIVEROS, Ricardo. Tipos, métodos y estrategias de investigación científica. *Pensamiento y Acción*. N°5, 2008. [Fecha de consulta: el 30 de abril del 2019] Disponible en: http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/articulos/imarpe/oceanografia/adj_modela_pa-5-145-tam-2008-investig.pdf

Tecnología de los bioprocesos –Diseño de biorreactores y fermentadores [Blog]. España, Madrid. Lázaro, Ana. (noviembre de 1997). [Fecha de Consulta: 29 de noviembre de 2019] Disponible en: <https://www.ingenieriatci.es/empresa>

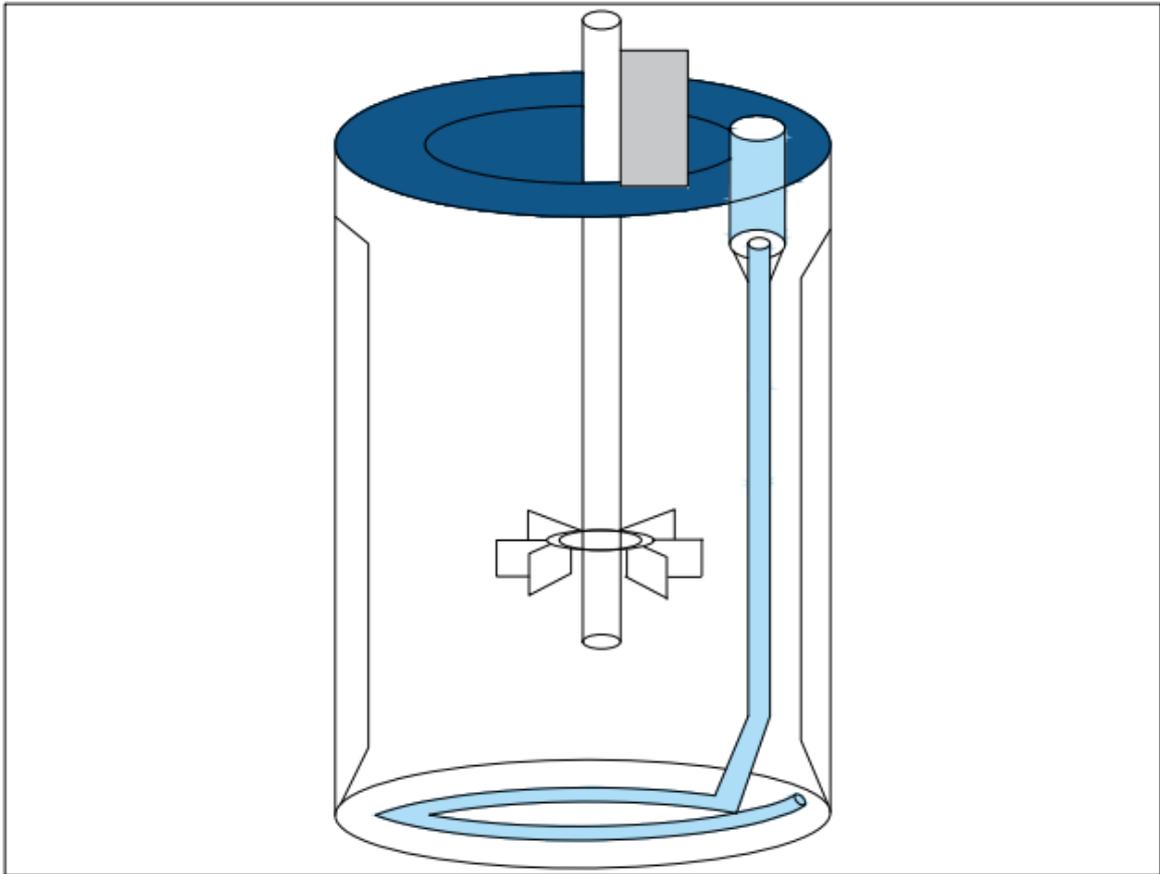
TRESIERRA Aguilar, Alvaro. *Biología Pesquera*, Perú. Editorial Libertad. 1993. 187 pp.

VARGAS, Frankiln [et. al]. Producción de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* utilizando espárrago (*Asparagus officinalis*) y su uso potencial para el control de la Malaria en la Libertad- Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* [En línea]. Vol. 18, n° 4-3, 2001. [fecha de consulta: el 14 de abril del 2019] Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342001000200006&lng=es&nrm=iso. ISSN 1726-4634

ZABALETA, Gina. Evaluación de la capacidad biocida de *Bacillus thuringiensis* h-14 var. *Israelensis* cultivado en sanguaza sobre larvas de *Aedes aegypti* en el distrito de Laredo la Libertad – Perú, 2008 – 2009. Tesis (Doctor en Ciencias Biológicas). Perú: Universidad Nacional de Trujillo, 2010. 75 pp. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/5919/Tesis%20Doctorado%20-%20Gina%20Zavaleta%20Espejo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

ANEXOS

Anexo N° 01: Diseño de biorreactores airlift de 1L



Fuente: Elaboración Propia

Anexo N° 02: Biorreactor Airlift De 5L



Fuente: Elaboración Propia

Anexo N° 03: Tabla 2. *Réplicas de Tratamientos*

	X1 /T1	X1 /T2	X1 /T3	X2 /T1	X2 /T2	X3 /T3	Combinación
G1	G1X1T1	G1X1T2	G1X1T3	G1X2T1	G1X2T2	G1X3T3	6
G2	G2X1T1	G2X1T2	G2X1T3	G2X2T1	G2X2T2	G2X3T3	6
G3	G3X1T1	G3X1T2	G3X1T3	G3X2T1	G3X2T2	G3X3T3	6
Combinación	3(X1T1)	3(X1T2)	3(X1T3)	3(X2T1)	3(X2T2)	3(X3T3)	6x3

Fuente: Elaboración propia

Donde:

G1= Repetición de pH 6 y temperatura 25°C.

G2= Repetición de pH 6 y temperatura 35°C.

G3= Repetición de pH 6 y temperatura 45°C.

G4= Repetición de pH 8 y temperatura 25°C.

G5= Repetición de pH 8 y temperatura 35°C.

G6= Repetición de pH 8 y temperatura 45°C.

Anexo N° 04: Resultados de los tratamientos

1er Tratamiento							
Condiciones		<i>Bt</i>	<i>Bt</i> esporulados	esporas	<i>Bt</i> totales	<i>Bt</i> que producen toxina	% de Producción de endotoxina
pH 6	T° 25	12500000	7500000	28500000	48500000	36000000	74
	T°35	75500000	456500000	69500000	601500000	526000000	87
	T°45	247000000	3000000	1500000	265500000	4500000	2
pH 8	T° 25	10500000	1500000	7500000	19500000	9000000	46
	T°35	60000000	7000000	9500000	76500000	16500000	22
	T°45	30500000	6000000	7000000	43500000	13000000	30

2do tratamiento							
Condiciones		<i>Bt</i>	<i>Bt</i> esporulados	esporas	<i>Bt</i> totales	<i>Bt</i> que producen toxina	% de Producción de endotoxina
pH 6	T° 25	24000000	10000000	41000000	75000000	51000000	68
	T°35	66000000	464000000	30000000	560000000	494000000	88
	T°45	368500000	4000000	0	372500000	4000000	1
pH 8	T° 25	8000000	2500000	5000000	15500000	7500000	48
	T°35	92500000	18000000	0	104500000	18000000	11
	T°45	25500000	11500000	6000000	43000000	17500000	41

		3er tratamiento					
Condiciones		<i>Bt</i>	<i>Bt</i> esporulados	esporas	<i>Bt</i> totales	<i>Bt</i> que producen toxina	% de Producción de endotoxina
pH 6	T° 25	21000000	2500000	38500000	62000000	41000000	66.13
	T°35	63000000	45000000	22000000	53500000	47200000	88
	T°45	418000000	3000000	0	421000000	3000000	0.71
pH 8	T° 25	7000000	1500000	2500000	11000000	4000000	36
	T°35	120000000	17000000	2000000	139000000	19000000	14
	T°45	31500000	5500000	9500000	46500000	15000000	32

Fuente: Elaboración Propia

Aquí podemos ver los datos de los tres tratamientos realizados donde se consideró para su respectivo conteo tres formas, una donde la *Bacillus thuringiensis* estaba solo como bacilo, otra es la *Bacillus thuringiensis* esporulada, y la otra donde la espora se encontraba fuera del bacilo. Así mismo se realizó la suma de todos los bacilos totales de cada tratamiento, y se calculó las bacillus que produjeron toxina, obteniendo así el porcentaje de producción de endotoxina por tratamiento.

Anexo N° 05: Resultados de los 18 tratamientos

Tratamiento	pH	Temperatura	Producción De Endotoxina Cry 10⁶
1	6	25	36.00
2	6	25	51.00
3	6	25	41.00
4	6	35	526.00
5	6	35	494.00
6	6	35	472.00
7	6	45	4.50
8	6	45	4.00
9	6	45	3.00
10	8	25	9.00
11	8	25	7.50
12	8	25	4.00
13	8	35	16.50
14	8	35	18.00
15	8	35	19.00
16	8	45	13.00
17	8	45	17.50
18	8	45	15.00

Anexo N° 06: Solicitud de obtención de muestra de sanguaza

CARGO



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"

Oficio N°01-2019

Señor:

ING. YOVANNY DETÁN
JEFE DE OPERACIONES- PESQUERA "EXALMAR S.A.A."
TRUJILLO-LA LIBERTAD

Presente. -

ASUNTO: SOLICITUD DE OBTENCIÓN DE MUESTRA DE SANGUAZA

Por intermedio del presente, es grato dirigirme a usted a fin de saludarlo a nombre de la Facultad de Ingeniería de la Universidad César Vallejo, y a la vez presentar a los estudiantes, AGUILAR LOZADA DIANA CAROLINA con DNI:71017542 y a JULCA REYES JAZAHEL NAOMI con DNI:70302712; estudiantes del IX ciclo de la escuela de INGENIERÍA AMBIENTAL

Los estudiantes: AGUILAR y JULCA, se encuentran desarrollando un proyecto de investigación de tesis denominado: "Efecto del pH y temperatura en sanguaza para la producción de endotoxina Cry de *Bacillus thuringiensis* como biopesticida", por lo cual los investigadores desean poder obtener la sanguaza de la empresa que dirige, ante ello se le solicita brindar el acceso a la empresa pesquera para obtención de la muestra.

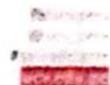
De este modo se estará contribuyendo al desarrollo de la investigación y generar nuevas alternativas para la reutilización del efluente sanguaza.

Estando seguro de contar con su apoyo, aprovecho la oportunidad para expresarle muestras de consideración personal;

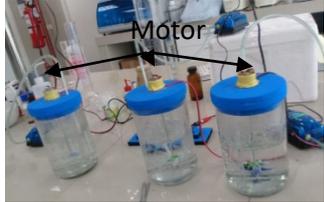

Ing. Yovanny Detán
Profesor de la Escuela de Ingeniería Ambiental

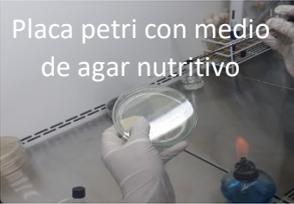
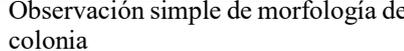
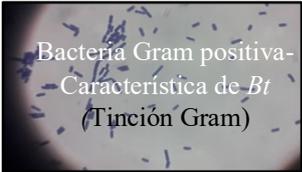
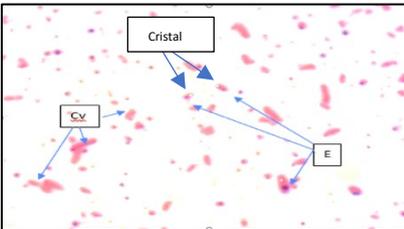
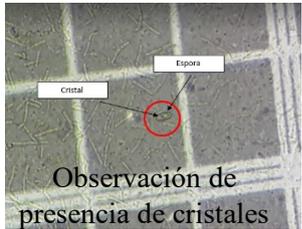

Mg. Megda Rubi Rodríguez Yupanqui
Coordinadora de la Escuela de Ingeniería Ambiental
DNI:18004976

CAMPUS TRUJILLO
Av. Larco 1270
Tel: (044) 485 000 Anx., 2000.
Fax: (044) 485 019

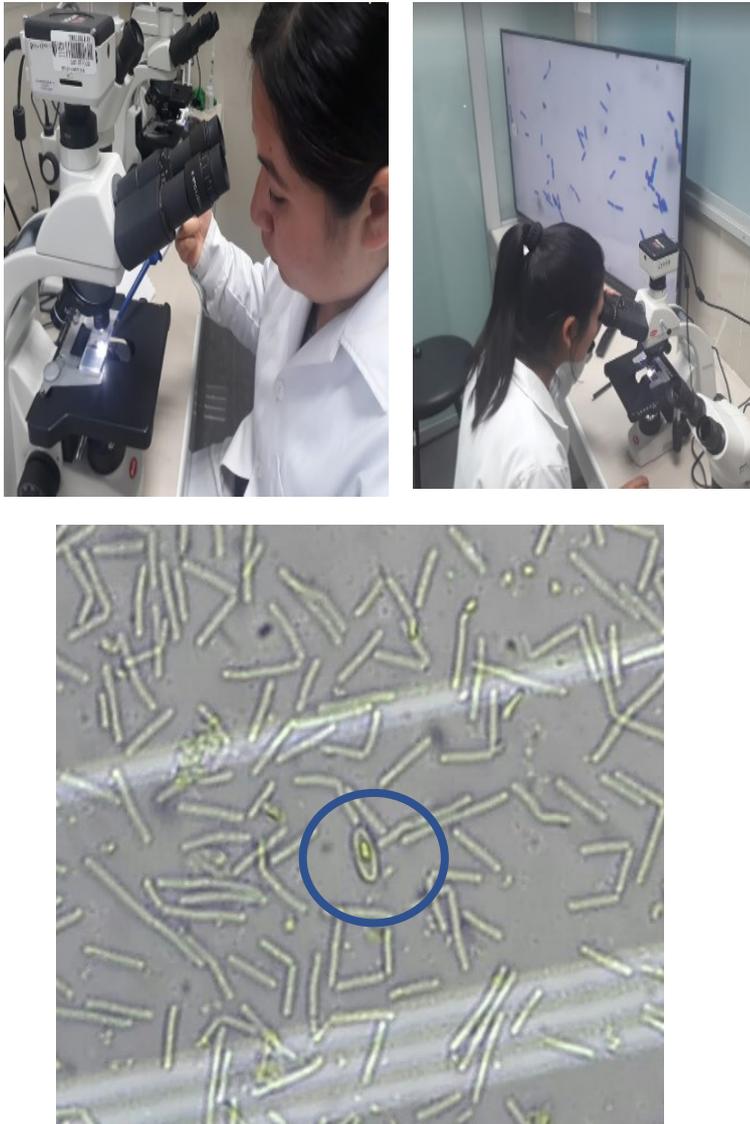


Anexo N° 07: Proceso de desarrollo de la tesis

<p>Ensamblaje de Biorreactores</p>	<p>3 biorreactores de 1 L</p> <p>1 biorreactor 5 L</p>	 <p>Asas de agitación</p>  <p>Motor</p> 
<p>Recolección de la muestra</p>	<p>6L de sanguaza proveniente de la industria pesquera “EXALMAR S.A.A.”</p>	 
<p>Obtención del microorganismo</p>	<p>Cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i> proveniente del lab. de Biotecnología e Ingeniería Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas del Departamento de Microbiología y Parasitología de la UNT.</p>	 

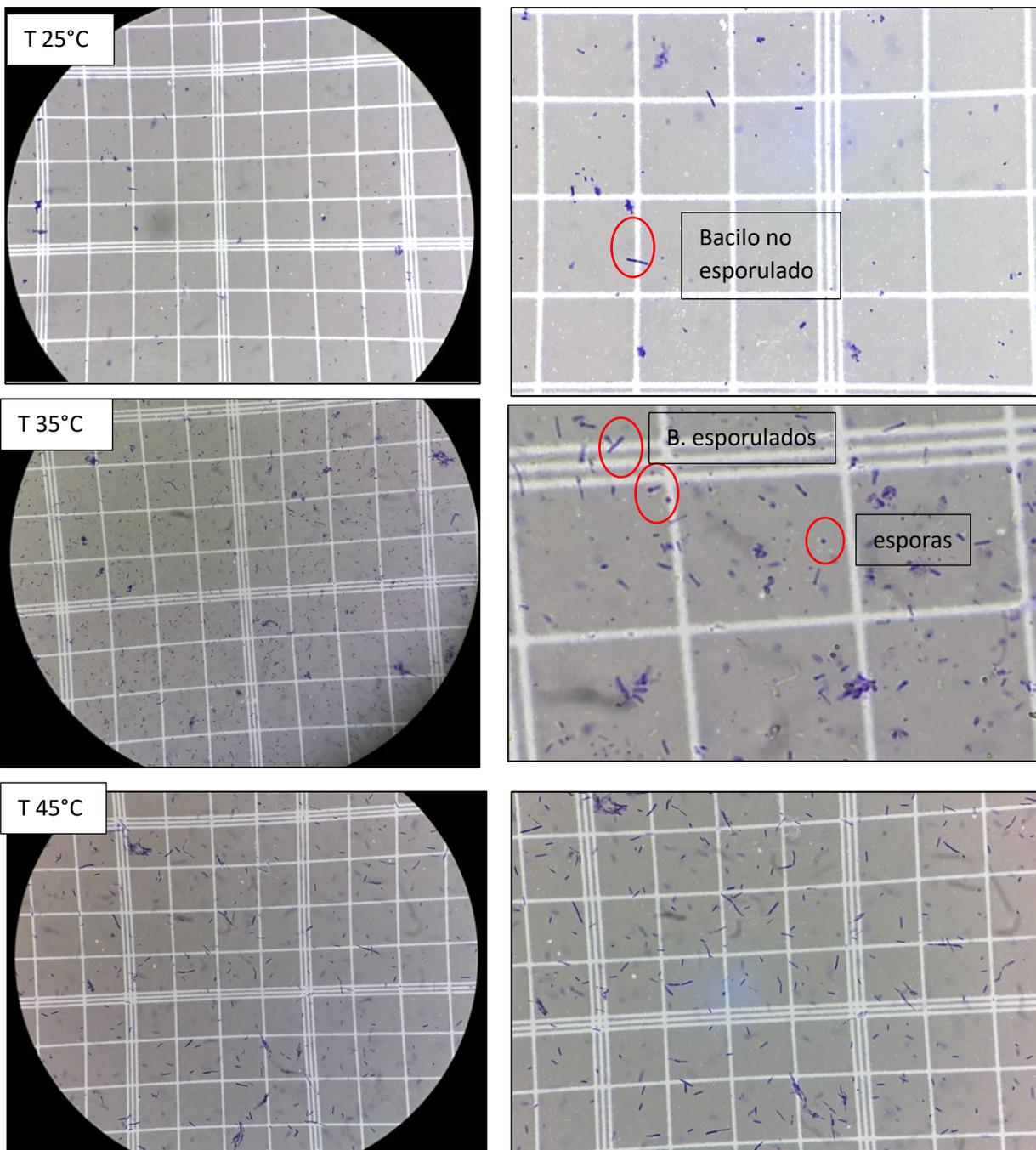
<p>Reconstitución de la cepa <i>Bacillus thuringiensis</i></p>	<p>Medio de cultivo Agar/ Método de estría</p> <p>Incubación por 48 horas/ 30°C</p>	 <p>Placa petri con medio de agar nutritivo</p>  <p>Sembrado de <i>Bt</i> por método de estría</p>  <p>Colonias de <i>Bt</i> /48 h</p>
<p>Prueba de identificación para <i>Bacillus thuringiensis</i></p>	<p>Observación simple de morfología de colonia</p> <p>Tinción Gram</p> <p>Tinción Verde de Malaquita</p> <p>Observación de presencia de cristales</p>	 <p>Colonia: grande, blanquecina opaca y bordes irregulares- Característica del género <i>Bacillus</i></p>  <p>Observación simple de morfología de colonia</p>  <p>Bacteria Gram positiva- Característica de <i>Bt</i> (Tinción Gram)</p>  <p>Cristal</p> <p>Cx</p> <p>E</p>  <p>Espora</p> <p>Cristal</p> <p>Observación de presencia de cristales</p>
<p>Estandarización del inóculo</p>	<p>Tubo N° 3 (9×10^8 cél/ mL.) del Nefelómetro de Mac Farland</p>	 <p>Comprobación de equipo calibrado con solución estándar</p>  <p>Toma de colonias para la obtención del inóculo</p>  <p>Dilución de colonias en solución salina estéril</p>  <p>Homogenización del inóculo</p>  <p>Lectura</p>

<p>Preparación del medio de cultivo</p>	<p>Biorreactor de 5 L/ 2000ml de medio fermentativo.</p>	     
<p>Condiciones del medio de cultivo</p>	<p>pH: 7 Temperatura: 30°C A incubadora/ 48 horas.</p>	     
<p>Producción de endotoxina Cry</p>	<p>División del medio fermentativo: 500ml para cada biorreactor de capacidad de 1L,</p>	 

<p>Condiciones de estrés</p>	<p>Variación del pH y temperatura para cada tratamiento respectivo.</p>	<p style="text-align: center;">Tratamiento G1</p> 
<p>Recuento de células y esporas</p>	<p>En cámara Neubauer/ 40 X</p>	

Fuente: Elaboración propia

Anexo N° 08: Comparación entre tratamientos



Fuente: Elaboración propia

Anexo N° 09: Análisis físico químico de sanguaza proveniente de la industria pesquera
“EXALMAR S.A.A.”



INFORME DE ENSAYO SATISAC-19-00681

SOLICITANTE (S) : Estudiantes del IX Ciclo de la UCV – Trujillo.
Diana Aguilar Lozada – Jazahel Julca Reyes

DOMICILIO LEGAL : Escuela de Ing. Ambiental – UCV, Trujillo.

ÍTEM DE ENSAYO : Residuo industrial pesquero

N° DE MUESTRAS : 01

Servicio solicitado : Ensayos físico químicos.

Presentación/Cantidad : Producto en envase de primer uso / 1 frascos de 500 mL.

Muestreo realizado por : Los Solicitantes.

Lugar de muestreo : Empresa pesquera Exalmar S.A.A. – Pto Malabrigo S/N.
(Informado por el solicitante).

Fecha y hora de muestreo: 15 de Julio del 2019 a las 10:00hrs.

Fecha de ingreso de la muestra : 15 de Julio del 2019.

Fecha de inicio de ensayos : 15 de Julio del 2019.

Fecha de término de Ensayos : 19 de Julio del 2019.

DATOS DE LA MUESTRA

ID de Muestra	Sanguaza
Preservación	Si – Refrigeración 2 – 4°C

RESULTADOS DE LA MUESTRA

DETERMINACIONES	Unidad	Resultado
pH	Valor de pH	6.72
Humedad	%	88.41
Proteínas	%	5.91
Grasas	%	1.45
Sales minerales	%	1.07

DETERMINACIONES	MÉTODOS DE ENSAYO
pH	SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 4500-H + B, 22nd Ed. 2012.
Humedad	Humedad .AOAC 930.15 20h Ed Loss on Drying (Moisture) for feeds (at 135 °C for 2 Hours) Dry Matter on Oven Drying for Feeds (at 135 °C for 2 Hours)
Proteínas	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS (Método Kjeldahl)
Grasas	Oil and Grease. Liquid-Liquid, Partition-Gravimetric Method

Trujillo, 19 de Julio del 2019.



 Ing. Carlos G. Caldas Nique
 Gerente General
 SATISAC E.I.R.L.



INFORME DE ENSAYO SATISAC-19-00756

SOLICITANTE (S) : Estudiantes del X Ciclo de la UCV – Trujillo.
Diana Aguilar Lozada – Jazahel Julca Reyes

DOMICILIO LEGAL : Escuela de Ing. Ambiental – UCV. Trujillo.

ÍTEM DE ENSAYO : Residuo industrial pesquero

Nº DE MUESTRAS : 01

Servicio solicitado : Ensayos físico químicos.

Presentación/Cantidad : Producto en envase de primer uso / 1 frascos de 500 mL.

Muestreo realizado por : Los Solicitantes.

Lugar de muestreo : Empresa pesquera Exalmar S.A.A. – Pto Malabrigo S/N.
(Informado por el solicitante).

Fecha y hora de muestreo: 15 de Julio del 2019 a las 10:00hrs.

Fecha de ingreso de la muestra : 09 de Setiembre del 2019.

Fecha de inicio de ensayos : 09 de Setiembre del 2019.

Fecha de término de Ensayos : 13 de Setiembre del 2019.

DATOS DE LA MUESTRA

ID de Muestra	Sanguaza
Preservación	Congelación a - 10°C

RESULTADOS DE LA MUESTRA

DETERMINACIONES	Unidad	Resultado
pH	Valor de pH	6.70
Humedad	%	89.05
Proteínas	%	5.82
Grasas	%	1.43
Sales minerales	%	1.05

DETERMINACIONES	METODOS DE ENSAYO
pH	SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 4500-H + B, 22nd Ed. 2012
Humedad	Humedad AOAC 930.15 20th Ed Loss on Drying (Moisture) for feeds (at 135 °C for 2 Hours) Dry Matter on Oven Drying for Feeds (at 135 °C for 2 Hours)
Proteínas	DETERMINACION DE PROTEINAS (Método Kjeldahl)
Grasas	Oil and Grease. Liquid-Liquid, Partition-Gravimetric Method

Trujillo, 13 de Setiembre del 2019.




Ing. Carlos G. Caldas Nique
Gerente General
SATISAC E.I.R.L.

Anexo N° 10: Composición del medio con sanguaza (1L)

Componentes	%
Almidón	0.05
KH ₂ PO ₄	0.025
Puré de tomate	0.4
CaCO ₃	0.01
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.000011
MnSO ₄	0.0004
FeSO ₄	0.0028
CaCl	0.0003
SUBTOTAL	0.5%
Sanguaza	1%
Agua destilada	98.5%
TOTAL	100%

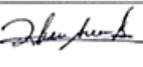
Anexo N° 11: Ficha de recolección de datos

- Primer tratamiento

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS					
GRUPOS EXPERIMENTALES	PH	T*	DATOS DETERMINADOS		
			Bacilo sin espora	Bacilo con espora	Espora
G1	6	25	1250000	7250000	285000
G2		35	7550000	45650000	526000000
G3		45	24700000	3000000	1500000
Observaciones					

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS					
GRUPOS EXPERIMENTALES	PH	T*	DATOS DETERMINADOS		
			Bacilo sin espora	Bacilo con espora	Espora
G1	8	25	10500000	1500000	75000000
G2		35	6000000	7000000	9500000
G3		45	30500000	6000000	7000000
Observaciones					

ESPECIALISTAS:

NOMBRE Y APELLIDO	FIRMA
Magaly De La Cruz Noviegi	
Luis Alberto Cabanillas Chirinos	
Walter Andrés Rojas Tiburcio	

ESPECIALISTAS:

NOMBRE Y APELLIDO	FIRMA
Magaly De La Cruz Noviegi	
Luis Alberto Cabanillas Chirinos	
Walter Andrés Rojas Tiburcio	

- Segundo tratamiento

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS					
GRUPOS EXPERIMENTALES	PH	T*	DATOS DETERMINADOS		
			Bacilo sin espora	Bacilo con espora	Espora
G1	8	25	8000000	2500000	5000000
G2		35	92500000	18000000	0
G3		45	25500000	11500000	6000000
Observaciones					

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS					
GRUPOS EXPERIMENTALES	PH	T*	DATOS DETERMINADOS		
			Bacilo sin espora	Bacilo con espora	Espora
G1	6	25	21000000	2500000	38500000
G2		35	63000000	45000000	22000000
G3		45	41800000	3000000	0
Observaciones					

ESPECIALISTAS:

NOMBRE Y APELLIDO	FIRMA
Magaly De La Cruz Noviegi	
Luis Alberto Cabanillas Chirinos	
Walter Andrés Rojas Tiburcio	

ESPECIALISTAS:

NOMBRE Y APELLIDO	FIRMA
Magaly De La Cruz Noviegi	
Luis Alberto Cabanillas Chirinos	
Walter Andrés Rojas Tiburcio	

- Tercer tratamiento

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS					
GRUPOS EXPERIMENTALES	PH	T*	DATOS DETERMINADOS		
			Bacilo sin espora	Bacilo con espora	Espora
G1	8	25	7000000	150000	2500000
G2		35	120000000	17000000	2000000
G3		45	31500000	5500000	9500000
Observaciones					

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS					
GRUPOS EXPERIMENTALES	PH	T*	DATOS DETERMINADOS		
			Bacilo sin espora	Bacilo con espora	Espora
G1	6	25	24000000	1000000	41000000
G2		35	6600000	464000000	30000000
G3		45	368500000	4000000	0
Observaciones					

ESPECIALISTAS:

NOMBRE Y APELLIDO	FIRMA
Magaly De La Cruz Noviega	
Luis Alberto Caramita Chirinos	
Walter Andrés Rojas Siburth	

ESPECIALISTAS:

NOMBRE Y APELLIDO	FIRMA
Magaly De La Cruz Noviega	
Luis Alberto Caramita Chirinos	
Walter Andrés Rojas Siburth	

Anexo N°12: Resultados de bioensayos en laboratorio

Se aplicó la siguiente ecuación para determinar el porcentaje de efectividad del biopesticida:

$$\%Efectividad = \frac{n^{\circ} \text{ de larvas muertas}}{n^{\circ} \text{ total de larvas}} * 100$$

- En larvas de 1er estadio

$$\%Efectividad = \frac{5}{5} * 100$$

$$\%Efectividad = 100$$

- En larvas de 2do estadio

$$\%Efectividad = \frac{5}{5} * 100$$

$$\%Efectividad = 100$$

- **En larvas de 3er estadio**

$$\%Efectividad = \frac{3}{5} * 100$$

$$\%Efectividad = 60$$

Anexo N° 13: Pruebas de normalidad para el factor pH.

Pruebas de normalidad							
ph	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	
produccion_toxina 6	,375	9	,001	,694	9	,001	
8	,183	9	,200*	,907	9	,293	

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.
a. Corrección de significación de Lilliefors

Fuente: SPSS

H0: El efecto del pH en sanguaza para la producción de endotoxina Cry sigue una distribución normal.

H1: El efecto del pH en sanguaza para la producción de endotoxina Cry no sigue una distribución normal.

Se acepta la hipótesis nula.

Anexo N° 14: Pruebas de normalidad para el factor temperatura

Pruebas de normalidad							
temperatura	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	
produccion_toxina 25	,281	6	,149	,858	6	,183	
35	,318	6	,059	,725	6	,011	
45	,283	6	,144	,849	6	,155	

a. Corrección de significación de Lilliefors

Fuente: SPSS

H0: El efecto del pH en sanguaza para la producción de endotoxina Cry sigue una distribución normal.

H1: El efecto del pH en sanguaza para la producción de endotoxina Cry no sigue una distribución normal.

Se acepta la hipótesis nula

Anexo N°15: Prueba de Igualdad de Levene de varianzas

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
produccion_toxina	Se basa en la media	4,530	5	12	,015
	Se basa en la mediana	2,759	5	12	,069
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	2,759	5	2,462	,250
	Se basa en la media recortada	4,410	5	12	,016

Fuente: SPSS

H0: El efecto del pH y temperatura en sanguaza para la producción de endotoxina cry es homogéneo.

H1: El efecto del pH y temperatura en sanguaza para la producción de endotoxina cry no es homogéneo.

Anexo N°16: Prueba Post hoc

produccion_endotoxina_cry

HSD Tukey^{a,b}

temperatura	N	Subconjunto	
		1	2
3	6	9,500	
1	6	24,750	
2	6		257,583
Sig.		,099	1,000

En esta tabla podemos observar dos grupos donde nos muestra que uno es casi idéntico y otro es diferente a ellos, esto quiere decir que las medias de cada de las temperaturas es diferente, siendo la temperatura 35°C la más significativa debido a que en el diagrama de caja la media es mayor a diferencia de la de 25°C y 45 °C que están al mismo nivel