

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE

Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales

Sustentabilidad y Tecnología

PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)

Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos II



**ITESO, Universidad
Jesuita de Guadalajara**

**4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos II
Escalamiento de bacteriófagos formulados para control biológico de la
mancha bacteriana (*Xanthomonas euvesicatoria*) en cultivos de chile
realizado en el CIATEJ**

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en Biotecnología, Alan Hinojosa Román

Profesor PAP: Dr. Gabriel Rincón Enríquez

Tlaquepaque, Jalisco, mayo, 2023

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP	2
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional	3
Resumen	5
1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional.....	5
1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto	7
1.2 Caracterización de la organización.....	8
1.3 Identificación de la(s) problemática(s).....	8
1.4. Planeación de alternativa(s).....	10
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora	13
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos	25
1.7. Bibliografía y otros recursos	27
Bibliografía.....	27
2. Productos	28
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia.....	30
3.1 Sensibilización ante las realidades	30
3.2 Aprendizajes logrados	31



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



COECYTJAL
Consejo Estatal de Ciencia
y Tecnología de Jalisco

El presente documento forma parte del proyecto:

“Fagoterapia vegetal para el control de enfermedades bacterianas en solanáceas de importancia agrícola”

Financiado por el Fondo de la Ciencia al Mercado (Convocatoria 2021). Apoyada por el Consejo Estatal de Ciencia y tecnología del Estado de Jalisco (COECYTJAL), clave 9878-2022

Líder del proyecto: Dr. Gabriel Rincón Enríquez

La investigación se desarrolló en el Laboratorio e Invernadero de Fitopatología de la Unidad de Biotecnología Vegetal y planta piloto de Biotecnología Industrial del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C. (CIATEJ) bajo la dirección del Dr. Gabriel Rincón Enriquez y asesoría del Dr. Alejandro Solís Sánchez y del Dr. Melchor Arellano Plaza.

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son experiencias socio-profesionales de los alumnos que desde el currículo de su formación universitaria- enfrentan retos, resuelven problemas o innovan una necesidad sociotécnica del entorno, en vinculación (colaboración) (co-participación) con grupos, instituciones, organizaciones o comunidades, en escenarios reales donde comparten saberes.

El PAP, como espacio curricular de formación vinculada, ha logrado integrar el Servicio Social (acorde con las Orientaciones Fundamentales del ITESO), los requisitos de dar cuenta de los saberes y del saber aplicar los mismos al culminar la formación profesional (Opción Terminal), mediante la realización de proyectos profesionales de cara a las necesidades y retos del entorno (Aplicación Profesional).

El PAP es un proceso acotado en el tiempo en que los estudiantes, los beneficiarios externos y los profesores se asocian colaborativamente y en red, en un proyecto, e incursionan en un mundo social, como actores que enfrentan verdaderos problemas y desafíos traducibles en demandas pertinentes y socialmente relevantes. Frente a éstas transfieren experiencia de sus saberes profesionales y demuestran que saben hacer, innovar, co-crear o transformar en distintos campos sociales.

El PAP trata de sembrar en los estudiantes una disposición permanente de encargarse de la realidad con una actitud comprometida y ética frente a las disimetrías sociales. En otras palabras, se trata del reto de “saber y aprender a transformar”.

El Reporte PAP consta de tres componentes:

El primer componente refiere al ciclo participativo del PAP, en donde se documentan las diferentes fases del proyecto y las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo de este y la valoración de las incidencias en el entorno.

El segundo componente presenta los productos elaborados de acuerdo con su tipología.

El tercer componente es la reflexión crítica y ética de la experiencia, el reconocimiento de las competencias y los aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.

Resumen

El PAP “Escalamiento de bacteriófagos formulados para control biológico de la mancha bacteriana (*Xanthomonas euvesicatoria*) en el cultivo de chile”, que da continuidad al proyecto iniciado en el CIATEJ y liderado por el Dr. Gabriel Rincón Enríquez, consta de una formulación a base de bacteriófagos con capacidad de controlar la enfermedad de mancha bacteriana provocada por *Xanthomonas euvesicatoria* (*Xe*). El principal objetivo es generar un escalamiento de la formulación fotoprotectora denominada Fagolytic a base de nanopartículas de zinc para bacteriófagos. Se plantearon tres objetivos específicos: Evaluar el crecimiento de los fagos líticos Φ XaF13 y Φ XaF18 producidos a nivel de planta piloto de 20 L y evaluar la efectividad biológica de Fagolytic para control de *Xanthomonas euvesicatoria* en el cultivo de chile en condiciones de invernadero y, además, dar continuidad al desarrollo de Fagolytic con características pre-comerciales compuesto a base de nanopartículas de zinc y los bacteriófagos Φ XaF13 y Φ XaF18.

Se produjeron los bacteriófagos a nivel de planta piloto en biorreactor de 20 L. Se efectuó la centrifugación y filtración del producto utilizando la técnica de doble placa para titular las concentraciones virales resultantes. Finalmente se establecieron los cultivos de chile en invernadero para la evaluación de efectividad biológica de Fagolytic.

Se produjeron lotes de 20 L de bacteriófagos Φ XaF13 y Φ XaF18 con concentraciones de 1×10^8 UFP/mL y 1.8×10^8 UFP/mL, con los cuales se elaborará el producto Fagolytic que servirá para una prueba de efectividad biológica en los cultivos de chile establecidos en el invernadero de CIATEJ.

1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional

El PAP es una experiencia de aprendizaje y de contribución social integrada por estudiantes, profesores, actores sociales y responsables de las organizaciones, que de manera colaborativa construyen sus conocimientos para dar respuestas a problemáticas de un contexto específico y en un tiempo delimitado. Por tanto, la experiencia PAP supone un proceso en lógica de proyecto, así como de un estilo de trabajo participativo y recíproco entre los involucrados.

El Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. (CIATEJ o el Centro) es perteneciente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT y desde su apertura ha realizado actividades de investigación, desarrollo tecnológico y de formación de recursos humanos en programas de educación superior, además de asistencia técnica a instituciones de diversos sectores mediante aplicación de ingeniería, información y gestión en el Estado de Jalisco, Entidades Federativas y todas aquellas que lo soliciten aún cuando se encuentren fuera del país. En el Centro se desempeña la Unidad de Biotecnología Vegetal como elemento sustantivo del CIATEJ sirviendo al sector agrícola, agropecuario y agroindustrial, con la finalidad de cooperar al desarrollo de la excelencia competitiva y vanguardista en los mercados globales contemporáneos.

El presente trabajo da continuidad al proyecto iniciado en el CIATEJ por la Unidad de Biotecnología Vegetal y liderado por el Dr. Gabriel Rincón Enríquez, el cual consta de una formulación a base de bacteriófagos, denominada Fagolytic, con capacidad de controlar la enfermedad de mancha bacteriana provocada por *Xanthomonas euvesicatoria* (*Xe*), a partir de este se propone un desarrollo del escalado del proceso y posteriormente a través de una prueba de efectividad se busca encontrar resultados coherentes a los trabajos previos que puedan conducir a la obtención de un producto pre-comercial. Dicho esto, el proyecto puede describirse como de carácter experimental teniendo que desarrollarse en escritorio, laboratorio de escala analítica y piloto, incluyendo el trabajo que implica la evaluación de efectividad biológica de la formulación en el cultivo de chile en condiciones de invernadero.

El objetivo general del proyecto es generar un escalamiento de la formulación fotoprotectora F4 a base de nanopartículas de zinc más los fagos Φ XaF13 y Φ XaF18 a dimensión de planta piloto de 20 L (Fagolytic) y posteriormente evaluar su efectividad biológica en el control de *X. euvesicatoria* sobre plantas de chile en condiciones controladas de invernadero. Ahora bien, los objetivos específicos para el proyecto se detallan de la siguiente forma:

- Evaluar el crecimiento de los fagos líticos Φ XaF13 y Φ XaF18 con formulación a base de nanopartículas de zinc a las dimensiones de una planta piloto de 20 L (Fagolytic).
- Evaluar la efectividad biológica de la formulación de fagos en control de *X. euvesicatoria* sobre plantas de chile en condiciones de invernadero.

- Dar continuidad a la generación de producto Fagolytic de características pre-comerciales de formulación compuesta a base de nanopartículas de óxido de zinc y de los fagos líticos Φ XaF13 y Φ XaF18.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

Las bacterias del género *Xanthomonas* spp. poseen generalmente una morfología de bastón, son Gram negativas y por lo tanto no esporuladas, aerobias obligatorias de metabolismo oxidativo y en la mayoría de los casos con flagelo polar único, sus condiciones óptimas de crecimiento son de temperaturas entre 25 y 30°C acompañadas por humedades altas [1]. Mayoritariamente las especies del género presentan colonias mucoides, convexas y amarillas al crecer en medio de cultivo YDC (levadura, dextrosa y carbonato de calcio), la pigmentación amarilla tiene como función proteger a la colonia de la luz solar y el daño oxidativo [2].

Existe una basta cantidad de estudios que demuestran la gran extensión y diversidad de genomas presentes en el género *Xanthomonas* spp. Esta bacteria es un patógeno que cuenta con gran plasticidad en su genoma que le permite tener altos niveles de especificidad en relación con su hospedero. Siendo así, la continua aparición de nuevas razas junto con la variedad genética le da condiciones para crecer a diferentes temperaturas y superar genes de resistencia del hospedero lo que supone un desafío para establecer métodos de control efectivos [3].

Con el fin de obtener una alternativa ecológica y factible de control de mancha bacteriana en cultivos de chile provocada por *Xe*, en el proyecto de tesis de maestría de Ibarra Rivera [4] se desarrolló una formulación (denominada F4) a nivel matraz compuesta a base de nanopartículas de zinc y/o titanio junto a los bacteriófagos líticos de *Xav* Φ XaF13 y Φ XaF18 (también denominados fagos, la formulacion se le denominó Fagolytic). La formulación no provocó limitantes en la efectividad biológica del fago y se logró prolongar significativamente su viabilidad bajo irradiaciones de UV y en condiciones de invernadero y campo. Las comparaciones entre las aplicaciones del fago con y sin la formulación demostraron su eficiencia, siendo que protege al fago de la exposición ultravioleta induciendo un control significativamente más eficiente de la enfermedad de mancha bacteriana.

Posteriormente la formulación evaluada por Ibarra Rivera [4] a nivel de laboratorio, sirvió de base del proyecto de tesis de maestría de Payan Almanza [5] para desarrollar un escalamiento de su producción en plantas piloto con biorreactores de 20 litros donde se obtuvieron resultados consistentes con los mostrados anteriormente. Siendo así, en el presente Proyecto de Aplicación Profesional (PAP) se busca dar continuidad a la generación del producto pre-comercial de formulación compuesta a base de nanopartículas de óxido de zinc y fagos líticos Φ XaF13 y Φ XaF18, denominada Fagolytic.

1.2 Caracterización de la organización

El proyecto “Escalamiento de bacteriófagos formulados para control biológico de la mancha bacteriana (*Xanthomonas euvesicatoria*) en cultivos de chile realizado en el CIATEJ” se desarrolló en el CIATEJ Subsede Zapopan en la Unidad de Biotecnología Vegetal. El CIATEJ se dedica al sector agrícola, agropecuario y agroindustrial a través de investigación; el desarrollo y servicios tecnológicos en la formación de recursos humanos, con el propósito de contribuir al incremento de ventajas competitivas e innovadoras en los mercados globales actuales. Al momento del presente escrito, los involucrados puntualmente en el proyecto fueron el Dr. Gabriel Rincón Enríquez como director del proyecto e investigador de CIATEJ y el Dr. Guillermo Alejandro Solís Sánchez como investigador asociado a este proyecto del CIATEJ.

1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

El chile *Capsicum annuum* (*C. annuum*) es un alimento de importancia económica y cultural en toda la República Mexicana, cultivado prácticamente en todo el país, presenta altos índices de consumo, rentabilidad y amplia necesidad de mano de obra. A nivel mundial, México se ha posicionado como el segundo mayor productor de *C. annuum* y principal exportador, siendo así el cultivo hortícola de segunda mayor importancia socioeconómica aportando 20% de toda la producción. No obstante, este integrante del sector agrícola mexicano se ha visto afectado por obstáculos en sus producciones como las enfermedades, una de ellas es la mancha bacteriana provocada por *Xanthomonas euvesicatoria* la cual está presente en todas

las regiones de la República y de no controlarse puede arruinar una producción completa de cultivo de Chile [6].

La mancha bacteriana es una enfermedad importante que afecta a las especies de *C. annuum*, actualmente se han caracterizado cuatro especies de *Xanthomonas* que la pueden provocar, denominadas: *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. gardneri* y *X. vesicatoria* siendo la primera la más relacionada con la enfermedad de mancha en *C. annuum*. Los síntomas de la enfermedad se manifiestan en los componentes aéreos de la planta (hojas, tallos y frutos), las lesiones tienen forma de pequeñas manchas que se vuelven grises con un centro necrótico y en el caso de las hojas de Chile enfermo se puede presentar color amarillento y defoliación generalizada, lo que afecta severamente al rendimiento final de la explotación; las lesiones del fruto (apreciables en la epidermis) son más pequeñas, “acorchadas” y levemente deprimidas, estas merman el rendimiento y la calidad e impiden la comercialización del producto final [7] [8].

Se han reportado medidas de prevención y control de la enfermedad de la mancha bacteriana como el empleo de variedades menos susceptibles, uso de barreras vivas, desinfección de equipos y herramientas, acción de agroquímicos a base de cobre y la erradicación de plantas contaminadas. Sin embargo, existen problemáticas que vuelven ineficientes a las técnicas anteriores tales como la contaminación de los suelos y agua por el uso excesivo de químicos a base de cobre, antibióticos agrícolas y la generación de resistencia en cepas bacterianas al mismo cobre y a las variedades menos susceptibles [9] [10]. Por lo tanto, se han empezado a buscar alternativas para métodos de control como organismos antagonistas de bacterias foliares y bacteriófagos, de los cuales los últimos ya se tienen antecedentes de su desarrollo para el biocontrol de especies de *Xanthomonas* remontándose a los inicios del siglo 20 [4], actualmente un verdadero reto es conseguir que posean una larga persistencia en la filósfera de la planta [11] [12].

Los bacteriófagos Φ XaF13 y Φ XaF18 puntualmente estudiados por el CIATEJ, son cepas de virus extraídas y aisladas por el Centro en suelo mexicano que han mostrado resultados significativos en estudios previos al presente PAP sobre mejoramiento de control de mancha bacteriana en Chile provocada por *X. euvesicatoria* en condiciones de invernadero.

Particularmente las formulaciones con el fago Φ XaF18 han sido las más eficientes y su efecto en los cultivos contaminados han sido comparados con los de métodos de control utilizados en la actualidad como los mismos antibióticos agrícolas [4].

1.4. Planeación de alternativa(s)

Los métodos utilizados en la actualidad en México para controlar al fitopatógeno de *X. euvesicatoria* en cultivo de chile se basan en su prevención, ya que el control químico resulta complejo por problemas como la capacidad de la bacteria de generar resistencia rápidamente ante la materia activa utilizada como compuestos cúpricos y antibióticos [13]. Siendo así, los métodos clásicos de control de la enfermedad terminan repercutiendo a largo plazo al cultivo del chile elevando los costes de su producción, reduciendo su efectividad y alterando el equilibrio de su ecosistema natural.

Dados los problemas generados por las estrategias poco efectivas para el control del fitopatógeno de *X. euvesicatoria* en cultivos de chile, se ha despertado el interés por el empleo de biocontrol por otros medios. El medio que se busca desarrollar en el presente PAP busca emplear a los virus denominados bacteriófagos de los que siempre se han visto en convivencia con la bacteria y los cultivos en condiciones naturales [14].

Experimento en biorreactor

Se establece el experimento con las mismas condiciones que las utilizadas en el trabajo de Ibarra Rivera [4] y las nuevas o posibles con base a las cantidades y proporciones para compararlas con la control. Al igual que en el primer escalamiento realizado por Payan Almanza [5], se valora el crecimiento con base a las dimensiones y condiciones propuestas del biorreactor, se determina la más óptima (temperatura, tiempo de inoculación, inducción de oxígeno, agitación) y se evalúa la carga inicial de inóculo, proporción fago/bacteria y el momento de la lisis más alta y también se utiliza pre-cultivo para las bacterias.

Evaluación de efectividad biológica

Se valorará el producto formulado Fagolytic en plantas de chile poblano bajo condiciones de luz y temperatura constantes, utilizando el formulado obtenido a nivel planta piloto, la formulación obtenida a nivel matraz, el producto antibacteriano, la formulación de referencia

y el control de fagos aplicados únicamente con agua. El experimento bajo condiciones de invernadero, se realiza en una infraestructura de polietileno que alberga a las plantas contenidas dentro de un cubículo.

Para estimar el efecto de los tratamientos sobre la mancha bacteriana en plantas de Chile, se toman como variables de respuesta las utilizadas en los trabajos anteriores: área foliar afectada, nivel de daño área foliar total, diámetro de tallo, altura de planta y biomasa. Estas variables son estimadas al día 20 después de la inoculación con *Xe* con un total de ocho repeticiones por tratamiento. Los resultados de las variables cuantitativas serán procesados mediante ANAVA y prueba múltiple con comparación de medias de Tukey, mientras que los resultados de la escala ordinal de severidad se analizan mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Se utiliza el programa Minitab Statistical Software [4]).

En Cuadro 1 se muestra el plan de trabajo del presente proyecto. Se especifican los recursos humanos, materiales y tecnológicos necesarios para cumplir cada actividad. Además se anota el tiempo requerido para llevar a cabo las actividades y la semana en la cual se planea realizarlas.

Cuadro 1. Cronograma de actividades previstas para el desarrollo y la realización del proyecto.

Semestre Primavera 2023																		
Actividad	Recursos	Tiempo	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11	Semana 12	Semana 13	Semana 14	Semana 15	Semana 16
Ensayo de técnicas generales	A, G, A, A, TP, PP, CF, IC	1																
Pruebas en biorreactores	A, G, A, A, TP, BR	1																

	, A M																	
Prueba en invernadero	IV, TP, A G, A A	20																
Análisis de datos	A G, TP, S W	10																
Revisión del RPAP por el director del proyecto	A G, TP, S W																	
Presentación oral del PAP ante personal del CIATEJ y docentes del ITESO	A G																	
ENTREGA FINAL DEL RPAP	A G																	

La Cuadro 2 muestra el significado de las abreviaturas utilizadas para referir los recursos necesarios en cada actividad planeada.

Cuadro .2. Abreviaturas de los recursos señalados en el cronograma de actividades.

Recursos utilizados	
Recursos utilizados	Abreviatura
Asesoría Dr. Gabriel	AG
Asesoría Dr. Alejandro	AA
Asesoría Dr. Melchor	AM
Trabajo personal	TP
Invernadero	IV
Biorreactor	BR
Centrífuga	CT
Placas petri	PP

Software	SW
Campana de flujo laminar	CF
Incubadora	IC

1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

Conservación bacteriana por ultra-congelación

La criopreservación es una técnica que implica el congelamiento de células o tejidos a temperaturas extremadamente bajas, entre -80 °C y -190 °C, lo que reduce el metabolismo celular a niveles casi nulos. Antes de ser congelados, los microorganismos se mezclan con un agente crioprotector para mejorar su capacidad de sobrevivir durante el proceso de congelación en comparación con si solo se suspendieran en agua [15].

El glicerol es uno de los compuestos más utilizados como crioprotector debido a que tiene la habilidad de estabilizar la estructura de la membrana celular al actuar como un radical hidroxilo. También es capaz de penetrar en la célula y actuar como nutriente, además de presentar una baja toxicidad biológica para las células y poder retener fragmentos de agua que puedan descongelarse a temperaturas bajas [16].

Cultivo de *Xanthomonas*

Las bacterias del género *Xanthomonas* son microorganismos de interés industrial, se han cultivado en medios compuestos por extracto de levadura al 0.3%, peptona de carne de bovino al 0.5% y glicerol al 2% con un pH óptimo de 7.00. Estas bacterias son aerobias obligatorias de metabolismo oxidativo y pueden ser cultivadas en medio líquido o sólido generado por agar, donde la mayoría de sus colonias son mucoides, convexas y amarillas [2] [4]. Las cepas de *X. euvesicatoria* que se emplearon en este estudio fueron: BV801, BV824 y BV865.

Cultivo microbiológico

Sembrar o inocular implica introducir de manera artificial una muestra o inóculo en un medio apropiado y protegido de contaminaciones con el objetivo de comenzar el cultivo de microorganismos para su crecimiento y reproducción. Después de sembrar, el medio de

cultivo se coloca en incubación a una temperatura alrededor de 28°C para el desarrollo microbiano [17].

Según el microorganismo de interés y el medio utilizado, pueden efectuarse diferentes tipos de siembra, lo que diversifica las posibilidades de empleo de técnicas para la propagación de un cultivo de interés. Los cultivos sólidos en placa pueden utilizarse para la obtención de aislamientos, son posibles de efectuar tanto en superficie (mediante instrumentos como el asa), así como en mezcla (donde el inóculo se encuentra en el medio con el agar todavía fundido y se mezclan para vertirse posteriormente a la placa). Los cultivos en medio líquido permiten el desarrollo de poblaciones grandes de microorganismos, éstas se ejecutan típicamente en tubos, frascos o matraces, es importante que antes y después de la siembra se pase la boca del recipiente sin tapa por la flama del mechero para esterilizar y evitar contaminaciones [17] [18].

Cultivo de bacteriófagos

Los bacteriófagos son entes biológicos que se replican infectando al hospedador bacteriano, lo hacen inyectando material genético (ARN o ADN) que contiene encerrado en una cápside protéica externa. Para multiplicar al bacteriófago es necesario hacerlo cultivándolo con la bacteria hospedadora considerando los parámetros básicos del cultivo y la propagación/infección de los bacteriófagos, tales como el sustrato adecuado para el hospedante y las temperaturas óptimas de crecimiento de ambas etapas [19] [20].

El cultivo de bacteriófagos generalmente se realiza en biorreactores de agitación conocidos en inglés como Stir Tank Reactors (STR), en este tipo de reactores los bacteriófagos pueden ser producidos en tres modos de operación: por lote, semi-contínuo y contínuo, cada uno con sus propias ventajas y desventajas. Actualmente la mayoría de esquemas de producción de bacteriófagos se basa en la operación por lote, donde pueden conseguirse altas concentraciones del producto, aunque es importante mencionar que sus largos tiempos de preparación pueden disminuir significativamente la productividad [21] [22].

Formulación protectora de los bacteriófagos (Fagolytic)

En el diseño de las formulaciones, se combinan varios compuestos para crear una solución fluida protectora en un disolvente acuoso. La solución incluye un acarreador, un dispersante, un protector/agente fotoprotector y un encapsulador opcional; finalmente se incorporan los fagos como ingrediente activo bactericida [4].

Cultivo de *Capsicum annuum*

El chile (*C. annuum*) es un cultivo que puede crecer en diferentes tipos de suelo, pero se desarrolla mejor en suelos franco-arenosos, franco limosos o francoarcillosos con alta materia orgánica y a profundidades de 0 a 30 centímetros. Sus frutos tienen forma cónica, miden alrededor de 12 a 15 cm de largo y 8 a 10 cm de ancho, se adapta a climas cálidos, pero no crece adecuadamente en temperaturas por debajo de los 10°C o por encima de los 35°C [4].

Sintomatología de mancha bacteriana

Dentro de lo que comprende la enfermedad de la mancha bacteriana provocada por *Xe* (*Xanthomonas euvesicatoria*), se pueden medir las variables de sintomatología que se manifiestan en los componentes aéreos de la planta, como hojas, tallos y frutos. Los pedúnculos y sépalos de los cultivos de chile son particularmente susceptibles a la bacteria, y las lesiones pueden tomar forma de pequeñas manchas que se vuelven grises con un centro necrótico. Además, en el caso de las hojas de chile enfermas, pueden presentarse de color amarillento y defoliación generalizada, lo que afecta severamente el rendimiento final de la explotación. Las lesiones del fruto también son pequeñas, "acorchadas" y levemente deprimidas, lo que disminuye su calidad y afecta la comercialización. En el caso del tallo y los pecíolos, las manchas son más alargadas. Es importante tener en cuenta que las lesiones causadas por la mancha bacteriana se diferencian fácilmente de los hongos fitopatógenos debido a la apariencia húmeda del biofilm que se forma en la parte abaxial de las hojas [7] [8].

Obtención de material biológico

Para el desarrollo del presente PAP, se utilizaron las cepas de *Xanthomonas* BV801 y BV865 obtenidas del Laboratorio de Fitopatología de la Unidad de Biotecnología Vegetal del

CIATEJ (LFC), previamente caracterizadas en el trabajo de maestría de Ibarra Rivera [4]. Las cepas se tomaron a partir de muestras conservadas en un ultra-congelador marca Thermo Scientific (Fig. 1) a -80°C dentro de crioviales marca Corning (Fig. 2) de 2 mL donde estaban en solución de medio NYG (0.5% de peptona, 0.3% extracto de levadura, 2% glicerol) con 20% en peso de glicerol nivel molecular a pH 7.



Figura 1. Ultra-congelador Thermo Scientific utilizado para crioconservación a -80°C de capas bacterinas.

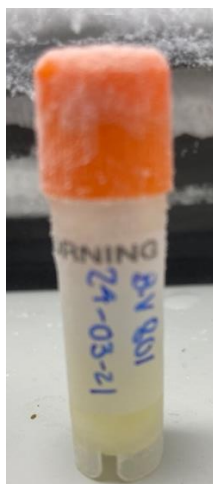


Figura 2. Criovial marca Corning utilizado para crioconservar cepas de Xe en condiciones de crioconservación a -80°C .

Cultivo de material biológico

Para obtener muestras aisladas y concentradas en medio líquido de las bacterias, en condiciones asépticas dentro de una campana de flujo laminar marca Veco (Fig. 3) (CFV)

del LFC, se sembraron las cepas BV801 y BV865 en cajas Petri con medio NYGA (0.5% de peptona, 0.3% extracto de levadura, 2% glicerol, 1.5% agar) haciendo uso de la técnica de estriado con asa bacteriológica y posteriormente se incubaron a 28 °C en una incubadora marca Prendo (Fig. 4) del Laboratorio de Fitopatología del CIATEJ (LFC) hasta que las bacterias crecieran y dieran lugar a unidades formadoras de colonia (UFC) que fuesen mucoides, convexas y amarillas (Fig. 5). Obtenidas las UFCs de cada bacteria, se tomaron en condiciones asépticas dentro de la CFV con el asa bacteriológica para inocularse en matraces Erlenmeyer estériles con medio NYG al 20% de volumen del matraz. Posteriormente se incubó el matraz por 18 h a condiciones de 28 °C y 250 rpm de agitación en una incubadora marca LabTech (Fig. 6). Después, se lavaron los cultivos con centrifugación usando tubos estériles de plástico en la centrífuga Multifuge X3R marca Thermo Scientific (Fig. 7) y se decantó el sobrenadante para resuspender el pellet en agua destilada estéril, este proceso se repitió dos veces.



Figura 3. Campana de flujo laminar marca Veco para el trabajo microbiológico de este proyecto.



Figura 4. Incubadora marca Prendo utilizada para incubación a 28 °C los microorganismos que se requieran para el desarrollo de este proyecto.

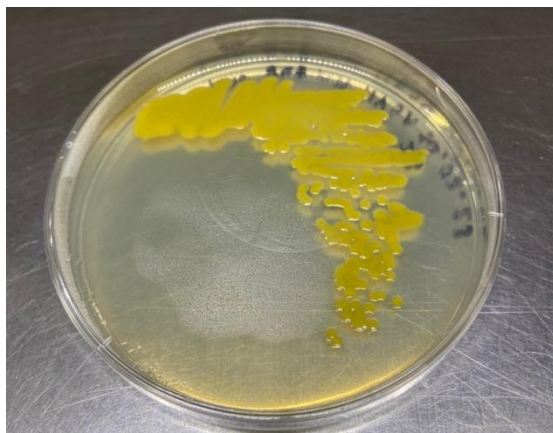


Figura 5. Cultivo de Xe presentando colonias (UFCs) de color amarillo, convexas y mucoides que fueron empleadas en el desarrollo del proyecto de investigación.



Figura 6. Incubadora agitadora marca LabTech para el cultivo bacteriano de forma líquida y que se empleó para el desarrollo del proyecto.



Figura 7. Centrífuga Multifuge X3R marca Thermo Scientific utilizada para lavado de cultivos de Xe y fagos producidos en biorreactor.

Producción de los bacteriófagos en biorreactores

En un biorreactor STR marca Applikon (Fig. 8) de 20 L de capacidad en la Planta Piloto de Bioprocesos de la Unidad de Biotecnología Industrial del CIATEJ (PPBC), se disolvieron 14 L de agua destilada, 42 g de harina de soya, 63 g de levadura desamarga, 210 mL de glicerol al 99 % Sigma-Aldrich y 14 mL de antiespumante Innovak para utilizarse como medio de cultivo para la producción de fagos. Las condiciones de esterilización fueron de 30 minutos a 118 °C y 21 atmósferas. Cuando se terminó de enfriar el sistema del biorreactor a 28 °C, se abrieron las conexiones de salida de aire, entrada de agua fría y vapor y posteriormente se

agregaron los pre-inóculos de la cepa BV865 ($36.55 \text{ mL a } 3.5 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$) y el fago a cultivar ($1.4 \text{ mL a } 3.5 \times 10^6 \text{ UFP/mL}$), cada bacteriófago se produjo por separado y ambos con la misma carga de inoculación. Al estabilizarse las condiciones a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ y 1 vvm , se monitorearon los parámetros del cultivo mediante el sistema de datos del reactor hasta que la producción cumpliera las 18 h y después se cosechó el producto denominado “crudo” en un bidón de plástico estéril de 20 L (Fig. 9). A partir de este punto, el crudo se conservó a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ en la Cámara de Refrigeración #2 de la Planta Piloto de Alimentos de la Unidad de Tecnología Alimentaria del CIATEJ (PPAC) siempre que fuese necesario almacenarse.



Figura 8. Biorreactor marca Applikon de 20 L utilizado para la producción bacteriana y de bacteriófagos para el desarrollo de este proyecto.



Figura 9. Ejemplo de bidón de 20 L utilizado para almacenar producto cosechado de biorreactor y posteriores operaciones antes preparar formulaciones que forma el ingrediente activo de Fagolytic.

Preparación de las formulaciones de bacteriófagos (Fagolytic) para su evaluación de efectividad biológica en condiciones de invernadero.

El crudo se vertió en tubos de plástico estériles con 300 mL de capacidad para centrifugarse en condiciones de 11000 g y 4 °C por 15 min por medio de la centrífuga Multifuge X3R marca Thermo Scientific (Fig. 7). El sobrenadante se pasó a otro bidón de plástico estéril de 20 L y el pellet o pastilla remanente se eliminó siguiendo la normativa de desechos de origen biológico del CIATEJ. Posteriormente el sobrenadante se sometió a un filtro tangencial marca Millipore (Fig. 10) con membrana de 0.20 μm diámetro de porosidad y el producto filtrado fue recogido en otro bidón de plástico estéril de 20 L. La preparación de los componentes de la formulación (además de los fagos) se realizó por separado a la respectiva concentración y posteriormente se adicionaron uno a uno en matraz con periodos de agitación constante tras ser añadido cada compuesto. El agente protector (óxido de zinc) se ajustó a pH de 6.2 ± 0.5 y el fago se añadió antes del quitosano a una concentración de 10^8 UFP mL^{-1} y las condiciones de esterilidad se mantuvieron durante todo el proceso. Los componentes y las concentraciones utilizadas para las formulaciones se muestran en el Cuadro 3.



Figura 10. Filtro tangencial marca Millipore utilizado para purificar el sobrenadante recolectado de bacteriófagos producidos en biorreactor y elaborar el producto Fagolytic.

Cuadro 3. Composición de la formulación F4 donde se incluye a fagos y otros componentes que componen al producto Fagolytic.

COMPONENTE DEL PRODUCTO FAGOLYTIC	CONCENTRACIÓN FINAL (%)
Solución de bacteriófagos (ΦXaF13 ó ΦXaF18)	0.000034
Óxido de zinc	0.6

D-Manitol	2
Quitosano	0.04
Lecitina	3
Agua	Lo que se requiera para 1 L

Al final también se tendría la composición de Fagolytic siguiente:

Ingrediente activo	Porcentaje de i.a.	Equivalente en g/Kg
Bacteriófagos activos contra <i>Xathomonas euvesicatoria</i> *	0.000034	0.00034
Otros ingredientes	99.999966	999.99966

*Contiene como mínimo 3.03×10^{12} unidades formadoras de placas (UFP) por litro de producto

Titulación de bacteriófagos

Se cultivó la cepa bacteriana BV865 previamente a 28 °C durante 18 h a 250 rpm, las muestras de bacteriófagos se recuperaron del producto cosechado, centrifugado y filtrado previo a la preparación de la formulación. Para cuantificar la concentración de los bacteriófagos se realizaron diluciones seriadas, de cada dilución se colocaron 5 μL en medio NYG con una segunda capa de agar NYG suave (0.6% agar) que se inoculó previamente con 400 μL de cultivo fresco de BV865. Las placas se incubaron a 28 °C durante 24 horas y posteriormente se cuantificaron (Fig. 11 y Fig. 12) y se determinó la concentración del virus en Unidades Formadoras de Placa de lisis por unidad de volumen mediante la ecuación (UFP / mL):

$$\frac{\# \text{ de placas } \times \text{ dilución}}{\text{Volumen de gota en mL}} = \text{Concentración viral } \left(\frac{\text{UFP}}{\text{mL}} \right).$$



Figura 11. Titulación en doble placa del bacteriófago ΦXaF13 en condiciones *in vitro*.

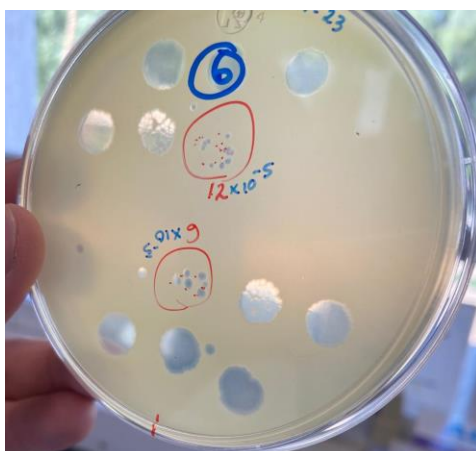


Figura 12. Titulación en doble placa del bacteriófago ΦXaF18 en condiciones *in vitro*.

Cuadro 4. Resultados obtenidos de concentración de bacteriófagos producidos en biorreactores de 20 L.

Lote (fecha de producción)	BACTERIÓFAGO	CONCENTRACIÓN (UFP/mL)
1 (23 de febrero)	ΦXaF18	4×10^5
2 (2 de marzo)	ΦXaF13	1×10^8
3 (13 de marzo)	ΦXaF18	1.8×10^8
4 (28 de marzo)	ΦXaF13	5×10^3
5 (19 de abril)	ΦXaF18	Sin crecimiento detectado
6 (21 de abril)	ΦXaF13	Sin crecimiento detectado

Preparación de plantas de chile en condiciones de invernadero

Se esterilizaron costales con sustrato formado por una mezcla de 40 % suelo, 55 % arena y 5 % de agroperlita marca Inimex proporcionados por el CIATEJ en un autoclave marca Vayremex (Fig. 11) a condiciones de 125 °C y 21 atmósferas por 6 horas. Se utilizó una parte

del sustrato estéril para establecer una charola de germinación (Fig. 12) humedecida con agua de la red de CIATEJ y una charola de plástico donde se sembraron semillas de “chile ancho San Luis” marca Crown Speed. Con el resto de sustrato y bolsas de plástico de 13.5 cm x 22.5 cm, se fabricaron macetas (Fig. 13) de 2 kg de sustrato donde se trasplantaron las plantas cultivadas en la germinadora que presentaran la cantidad mínima de 2 hojas verdaderas, se realizó una fertilización con triple 16 (nitrógeno, potasio y fósforo) y el riego de agua se proporcionó cada dos días. Las plantas se mantuvieron en un cubículo del Invernadero 3 de Fitopatología del CIATEJ hecho de polietileno.



Figura 13. Autoclave marca Vayremex utilizado para esterilizar sustrato para cultivo de plantas de chile en condiciones de invernadero.



Figura 14. Charola de plástico utilizada para germinación de plantas de chile usadas en el experimento para la prueba de efectividad biológica en condiciones de invernadero.



Figura 15. Maceta con planta de chile utilizadas en el experimento de efectividad biológica con el producto Fagolytic.

Continuación de experimentación

Con el tiempo que se dedicó a la generación de concentraciones adecuadas de bacteriófagos en los lotes producidos en el biorreactor de planta piloto de 20 L y la obtención de todos los componentes necesarios para la formulación, el periodo de evaluación del presente PAP no fue suficiente para terminar de cumplir los objetivos del proyecto. Sin embargo, se dará seguimiento a la experimentación y ejecución de las pruebas de efectividad biológica, para la valoración de los productos de características pre-comerciales compuestos de bacteriófagos y nanopartículas de zinc para el control de la mancha bacteriana en chile provocada por *X. euvesicatoria*, que se desarrollaron en las instalaciones del CIATEJ.

1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

Los resultados obtenidos de las titulaciones de los lotes 2 y 3 de bacteriófagos producidos en los biorreactores de 20 L (Cuadro 4) mostraron concentraciones aptas para la prueba de efectividad biológica en cultivos de chile a condiciones de invernadero que se contempla ejecutarse al terminarse la formulación de los productos Fagolytic. Las dimensiones de concentración de los fagos son cercanas a las obtenidas por Payan [5] en su cultivo a nivel matraz; las plantas cultivadas en los invernaderos crecieron de forma adecuada y se

encuentran aptas para los experimentos que darán continuidad y validez al desarrollo del producto.

El mantenimiento de condiciones de esterilidad en la producción de los bacteriófagos es esencial para su cultivo adecuado a cualquier nivel, aunque estos no sean susceptibles a otros microorganismos que puedan presentarse en el medio gracias a su especificidad, es la misma *X. euvesicatoria* que toma el papel de hospedador para la replicación de los bacteriófagos la que no crecerá adecuadamente si el medio en que está presente se encuentra contaminado. Además, las mismas contaminaciones pueden perturbar los resultados de titulación de los bacteriófagos, lo que impide la evaluación eficiente de su producción.

La prueba de efectividad biológica en condiciones de invernadero confirmará la eficiencia de la metodología desarrollada en el presente PAP para el escalamiento del producto pre-comercial del producto Fagolytic, lo que contribuirá en el control del fitopatógeno de mancha bacteriana provocada por *X. euvesicatoria* presente en el territorio mexicano dedicado a la producción agrícola de Chile.

CONCLUSIONES

Se logró evaluar el crecimiento de los bacteriófagos líticos Φ XaF13 y Φ XaF18 en biorreactor de planta piloto con capacidad de 20 L utilizando la cepa bacteriana BV865 como agente hospedante, obteniendo resultados de concentración de los fagos de dimensiones cercanas a las de Payan [5]. Debido al tiempo requerido para terminar la experimentación en planta piloto, no se ha ejecutado todavía la prueba de efectividad biológica del producto del bioreactor de 20 L en las plantas de Chile en condiciones de invernadero. Sin embargo, fue posible preparar las plantas de Chile con sustrato estéril en condiciones de invernadero y crecimiento suficiente para realizar las pruebas de efectividad del producto Fagolytic del control del fitopatógeno de mancha bacteriana provocada por *X. euvesicatoria*. Con los resultados mencionados, siendo los dos lotes de los bacteriófagos Φ XaF13 y Φ XaF18 a concentraciones adecuadas para la formulación del producto Fagolytic y la preparación de las plantas a condiciones de invernadero para su prueba de efectividad biológica, se consiguió dar continuidad a la generación del producto de características pre-comerciales de formulación compuesta a base de nanopartículas de zinc y bacteriófagos.

1.7. Bibliografía y otros recursos

Bibliografía

- [1] S. C. Montesdeoca, «Características generales y relación hospedero-patógeno del género *Xanthomonas* spp.: Revisión de Literatura.» Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. , Municipio de San Antonio de Oriente, 2021.
- [2] W. J. Z. L. Y. F. H. Y.-Q. J. B.-L. B. L. X. Y. D. Z. T. J.-L. He Y-W, «*Xanthomonas campestris* diffusible factor is 3-hydroxybenzoic acid and is associated with xanthomonadin biosynthesis, cell viability, antioxidant activity, and systemic invasion.» *Mol Plant Microbe Interact*, vol. 24, n° 8, pp. 948-957, 2011.
- [3] A. T. L. F. P. D. Adhikari P, «Advances and Challenges in Bacterial Spot Resistance Breeding in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.).» *Int J Mol Sci*, vol. 21, n° 5, pp. 1-14, 2020.
- [4] G. Ibarra Rivera, «Control biológico de la mancha bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*) en el cultivo de chile mediante bacteriófagos formulados.» Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C., Zapopan, 2019.
- [5] J. D. Payan Almanza, «Formulación a base de bacteriófagos para el biocontrol de la mancha bacteriana en el cultivo de solanáceas: producción en planta piloto y evaluación pre-comercial.» Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C., Zapopan, 2023.
- [6] O. R. H. V. O. M. C. J. C. C. C. J. A. C. Á. E. A. G. G. R. D. H. O. J. d. J. C. C. Á. O. E. H. M. Mancilla Villa, «Profitability in maize (*Zea mays* L.) and chile (*Capsicum annuum* L.) with conventional and alternative management in Autlán, Jalisco.» *Idesia*, vol. 38, n° 3, pp. 33-42, 2020.
- [7] C. Reyes, «Mancha bacteriana en tomate - *Xanthomonas vesicatoria*,» *PANORAMA agro.com*, 2017.
- [8] A. M. S. d. C. R. C. & C. d. C. Quezado-Duval, «Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces,» *Appl Environ Microbiol*, vol. 73, n° 6, 2007.
- [9] C. B. M. G. J. J. G. J. Behlau F, «Molecular Characterization of Copper Resistance Genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* *citrumelonis*,» *Appl Environ Microbiol*, vol. 77, n° 12, pp. 4089-4096, 2011.
- [10] F. J. V. G. S. D. Marin VR, «Recent advances in the biocontrol of *Xanthomonas* spp,» *World Biotechnol*, vol. 35, n° 5, p. 72, 2019.
- [11] B. B. M. M. S. L. W. M. J. J. Iriarte FB, «Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces,» *Appl Environ Microbiol*, vol. 73, n° 6, pp. 1704-1711, 2007.
- [12] J. J. M. M. O. S. Balogh B, «Persistence of bacteriophages as biocontrol agents in the tomato canopy,» *Acta Horticulture*, n° 695, pp. 299-302, 2005.

- [13] L. M. Alexander, «Meister Media Worldwide,» 2 Agosto 016. [En línea]. Available: <https://www.hortalizas.com/cultivos/metodos-de-control-para-la-mancha-bacteriana-y-la-marchitez-manchada/>. [Último acceso: 2013 Marzo 3].
- [14] R. Nakayinga, A. Makumi y V. Tumuhaise, «Xanthomonas bacteriophages: a review of their biology and biocontrol applications in agriculture,» *BMC Microbiol*, vol. 21, p. 219, 2021.
- [15] Y. Ocares y J. F. Castro, «Preservación de microorganismos por congelación,» de *Boletín INIA*, Santiago, Chile, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, pp. 119-134.
- [16] M. Lozano y L. Clavijo, «Evaluación del mantenimiento de bacterias por tres técnicas de congelación a mediano plazo,» Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2001.
- [17] E. Santambrosio, M. Ortega y P. Garibaldi, «Siembra y recuento de microorganismos,» 2009. [En línea]. Available: https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practicoIII.pdf. [Último acceso: 26 Marzo 2023].
- [18] C. Urzua, «Media Campus,» Universidad Nacional Autónoma de México, 2021. [En línea]. Available: <https://mediacampus.cuaieed.unam.mx/node/4253>. [Último acceso: 2021 Marzo 2023].
- [19] G. Gaviria, M. Gonzalez y J. Castaño, «Técnica para aislamiento de bacteriófagos específicos para E.coli DH5 α a partir de aguas residuales,» *MVZ Córdoba*, vol. 17, n° 1, pp. 2852-2860, 2011.
- [20] R. Garcia, S. Latz, J. Romero, G. Higuera, K. Garcia y R. Bastias, «Bacteriophage Production Models: An Overview,» *frontiers in Microbiology*, vol. 10, n° 1187, pp. 1-7, 2019.
- [21] K. Jurač, D. Nabergoj y A. Podgornik, «Bacteriophage production processes,» *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 103, pp. 685-694, 2019.
- [22] M. Agboulage y D. Sauvageau, «Bacteriophage Production in Bioreactors,» *Methods in Molecular Biology*, vol. 1963, pp. 173-193, 2018.
- [23] E. S. Muñoz Equihua, «Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con células permeabilizadas de *Candida apicola*,» Centro De Investigación Y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C., Zapopan, 2016.

2. Productos

Se utilizaron los parámetros previamente desarrollados por Payan [5] para generar producciones a nivel planta piloto en biorreactor de 20 L de la formulación del producto pre-comercial compuesto a base de los bacteriófagos Φ XaF13 y Φ XaF18. Además, se establecieron las plantas de Chile en condición de invernadero preparadas para la

experimentación correspondiente a las pruebas de efectividad biológica de la formulación de bacteriófagos.

Nombre y código del PAP	4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos II
Nombre del proyecto	Escalamiento de bacteriófagos formulados para control biológico de la mancha bacteriana (<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>) en el cultivo de chile realizado en condiciones de invernadero del CIATEJ
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Producto: Cosechas centrifugadas y filtradas de bacteriófagos Φ XaF13 y Φ XaF18 producidas en biorreactor de 20 L a concentraciones de 1×10^8 y 1×10^8 UFP/mL respectivamente. Las cosechas son adecuadas para iniciar formulaciones fotoprotectoras a base de zinc (Fagolytic) y dar continuidad al proyecto liderado por el Dr. Gabriel Rincón Enríquez en CIATEJ para evaluar su efectividad biológica en cultivos de chile en condiciones de invernadero.
Autores:	Alan Hinojosa Román

Nombre y código del PAP	4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos II
Nombre del proyecto	Escalamiento de bacteriófagos formulados para control biológico de la mancha bacteriana (<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>) en

	el cultivo de chile en condiciones de invernadero realizado en el CIATEJ
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Producto: 150 plantas de chile (<i>Capsicum annuum</i>) sembradas en macetas y en condiciones de invernadero. Servirán para efectuar las pruebas de efectividad biológica de las formulaciones compuestas a base de bacteriófagos y nanopartículas de zinc y dar continuidad al desarrollo del producto de características pre-comerciales (Fagolytic) en las instalaciones de CIATEJ.
Autores:	Alan Hinojosa Román

3. Reflexión crítica y ética de la experiencia

El RPAP tiene también como propósito documentar la reflexión sobre los aprendizajes en sus múltiples dimensiones, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto para compartir una comprensión crítica y amplia de las problemáticas en las que se intervino.

3.1 Sensibilización ante las realidades

El uso de alternativas sustentables para controlar las plagas en cultivos hortícolas de México plantea cuestiones que se deben considerar cuidadosamente. Por un lado, el uso de pesticidas y otros productos químicos tóxicos ha tenido efectos negativos en el medio ambiente y la salud humana. Por otro lado, el control de plagas es necesario para proteger los cultivos y así garantizar una producción de alimentos adecuada.

Se puede decir que en este contexto, la búsqueda de alternativas sustentables para el control de plagas es un esfuerzo ético y responsable. La técnica de control propuesta por este PAP, puede ser efectiva sin causar efectos antagónicos en el medio ambiente o la salud humana, lo que puede tener un impacto positivo en la comunidad.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que la implementación de estas alternativas puede requerir de inversiones significativas en términos de tiempo, recursos y capacitación. Además, es posible que los agricultores no estén dispuestos a optar por la implementación de técnicas alternativas si éstas implican esfuerzos o costos más elevados.

En conclusión, el empleo de alternativas sustentables para controlar plagas en cultivos hortícolas en México es un esfuerzo que puede denominarse como ético y responsable y que puede tener un impacto positivo en la salud del medio ambiente, del ser humano y de la economía de la comunidad. Sin embargo, es necesario gestionar cuidadosamente los costos y beneficios de estas alternativas para garantizar que se brinden los recursos adecuados a los agricultores para implementarlas de forma efectiva.

3.2 Aprendizajes logrados

El haberme involucrado en este proyecto, me dio la oportunidad de empapararme de distintas disciplinas que forman parte de la biotecnología. Siendo estas la microbiología con un acercamiento importante a virología, la ingeniería de biorreactores y la biotecnología vegetal. El hecho de estudiar ingeniería en biotecnología implica adentrarse en áreas del conocimiento que pueden considerarse diversas y que este proyecto me permitió reunir los conceptos teóricos y herramientas de investigación para ayudar a desarrollar una solución es algo que considero muy valioso, destacando el tiempo que puede pasar aprendiendo de investigadores expertos de sus líneas de trabajo.

Durante mi experiencia de trabajo en las instalaciones de CIATEJ, estuve compartiendo espacio, herramientas y aprendizaje con otros estudiantes que realizaban actividades de investigación. Fue aquí donde desarrollé mis capacidades de trabajo en equipo, paciencia y compromiso, ya que fueron varias situaciones donde mis compañeros me apoyaron a seguir aprendiendo y yo los ayudé de la misma forma, agregando que, aunque este proyecto fuese emocionante para mí, tuve que ser perseverante para no detener el avance de los resultados ya que participar en investigación muchas veces implica sacrificar tiempo libre y naturalmente dedicar esfuerzo al estudio que permita comprender lo que se hace y debe hacer.

Estoy muy agradecido de haber tenido la oportunidad de participar en este proyecto y considero que, junto con los aprendizajes académicos pude desarrollar competencias que la educación de una universidad jesuita puede ofrecer por lo que ahora puedo sentirme más identificado con el ITESO.

3.3 Inventario de competencias Inicial (ingreso del PAP) e Inventario de competencias Final (salida al PAP).

	Competencia	Evidencia	Relevancia/Fortaleza*	
Categoriza las competencias en conocimientos, habilidades y actitudes. Escribe la o las evidencias de cada competencia y su relevancia.	Conocimientos	Principios de modelaje de escalado de biorreactores	Estudié el contenido e hice las entregas relacionadas en la clase de Ingeniería de Biorreactores	Puedo generar escalamientos de procesos prediseñados de procesos en biorreactores
		Planeación experimental de pruebas para obtención de modelos cinéticos.	Realicé un proyecto de cinética de crecimiento de guisantes con diferentes tratamientos.	Puedo planear experimentos para evaluar cinéticas químicas y biológicas
		Principios de funcionamiento de órganos y tejidos vegetales.	Realicé trabajos de estudio de procesos, tejidos y órganos de plantas.	Puedo analizar procesos y fenómenos de células o metabolitos de origen vegetal.
		Virología	Durante el PAP estudié la naturaleza de propagación de bacteriófagos y me involucré en un escalamiento de su producción.	Puedo realizar trabajo a nivel laboratorio y planta piloto con bacteriófagos, teniendo en cuenta el tipo de cuidados que se necesitan y comprendiendo los procesos de su producción, purificación y cuantificación.
		Fitopatología	Durante el PAP estudié el	Puedo hacer trabajo de investigación para control de

		desarrollo y control de la mancha bacteriana en Chile provocada por <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> .	enfermedades causadas por patógenos en cultivos de hortalizas, entendiendo su naturaleza y utilizando herramientas para encontrar métodos de control sustentables.
Habilidades	Recabado de información científica confiable para desarrollo de trabajos/proyectos	He realizado entregas y protocolos que requirieron revisiones literarias veraces y confiables.	Puedo buscar información científica necesaria para continuación y desarrollo de trabajos/proyectos.
	Uso de herramientas TIC para acceso a información y desarrollo de trabajos y proyectos.	Desde el inicio de mi licenciatura el empleo correcto de estas herramientas ha sido esencial para generar trabajos de calidad.	Puedo aprovechar las herramientas para generar trabajos/proyectos de calidad.
	Técnicas de laboratorio de microbiología.	Durante el PAP utilicé la técnica y herramientas para trabajar con el equipo de laboratorio y emplear el material biológico para desarrollar el proyecto.	Puedo emplear equipo de laboratorio para manejar material de origen biológico en trabajos de investigación y producción.
	Empleo de equipo de bioprocesos de planta piloto.	Durante el PAP utilicé equipo a nivel de planta piloto de 20 L para controlar	Puedo utilizar equipo a nivel de planta piloto para control de bioprocesos, monitorear las condiciones de operación y controlar

			producciones de bacteriófagos utilizando bacteria como hospedero.	resolver problemas que surjan de improviso.
		Trabajo de cultivo en invernadero.	Durante el PAP realicé cultivos de chile en condiciones de invernadero, involucrándome desde la mezcla y esterilización de sustrato hasta el trasplante de plántulas y su mantenimiento en macetas.	Puedo utilizar equipo y materiales de invernadero para establecer cultivos ideales para realización de experimentos.
Actitudes		Disposición a discutir y escuchar para tomar las mejores decisiones en equipo.	Trabajé con equipos que requirieron toma de decisiones colectivas.	Puedo trabajar en conjunto buscando el mejor desempeño colectivo en un trabajo/proyecto.
		Capacidad de trabajar y aprender de forma independiente y en equipo.	Al requerirlo he buscado aprender tanto por mi cuenta y he apoyado a mis equipos para desempeñar trabajos o terminar proyectos.	Puedo desarrollar mis competencias que impliquen el trabajo o desarrollo de un proyecto, tanto de forma individual, en equipo o bajo supervisión.
		Búsqueda constante para mejorar desempeño personal.	Pregunté por aspectos a mejorar u oportunidades de aprendizaje a superiores y compañeros de equipo.	Puedo seguir creciendo como persona y como profesional.

		Compromiso	Me involucré completamente en el desarrollo de mi PAP, utilizando todos los recursos a mi disposición para aportar al proyecto sin importar el empleo de mi tiempo libre.	Puedo comprometerme con un proyecto y utilizar toda mi capacidad para desarrollarlo y aprender mientras lo hago.
--	--	------------	---	--

Puedo responder de forma asertiva a situaciones adversas, mantener una postura positiva y procurar el bien común. También empleo conocimientos y herramientas de distintas disciplinas para obtener soluciones con el mismo fin, manteniéndome abierto al aprendizaje que el trabajo pueda brindarme. Pude trabajar de forma perseverante, comprometerme y procurar la sana y agradable convivencia para mantener el ambiente sano en mi y mi alrededor, gusto de procurar las perspectivas positivas y al mismo tiempo prepararme para afrontar las negativas tratándose tanto de mi como de las personas de mi comunidad. Entiendo que el trabajo presencial es importante, pero considero que el involucrarse de lleno y utilizar todo a la mano para aprender, incluso en espacios fuera de trabajo, pueden tener impactos significativos al desarrollo del trabajo o de un proyecto.