

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE

Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales

Sustentabilidad y Tecnología

PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)

Programa de Desarrollo Tecnológico para la Sustentabilidad Ambiental, Energética y Alimentaria



**ITESO, Universidad
Jesuita de Guadalajara**

4D09 Ecosistemas de economía circular, escenario Biocontrol

“Formulación de una matriz celulolítica sólida y líquida para *Bacillus subtilis* - *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas aeruginosa* como producto mínimo viable para la captación de nutrientes y protección de plantas.”

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en Biotecnología Ximena De Unánue Gutiérrez

Ing. en Biotecnología Lizbeth Valenzuela Rodríguez

Profesor PAP: Dr. Alejandro Arana Sánchez & Dr. Luis Eduardo Segura García

Tlaquepaque, Jalisco, Diciembre, 2022

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP	2
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional.....	2
Resumen	0
1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional.....	0
1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto	0
1.2 Caracterización de la organización.....	1
1.3 Identificación de la(s) problemática(s).....	1
1.4. Planeación de alternativa(s).....	1
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora	2
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos	2
1.7. Bibliografía y otros recursos	2
1.8. Anexos generales.....	2
2. Productos	3
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia.....	4
3.1 Sensibilización ante las realidades	4
3.2 Aprendizajes logrados	4

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.

En caso de requerirse alguna adecuación al nombre de las fases propuestas para este componente, se puede realizar siempre y cuando sea complementario a lo ya establecido.

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

En el presente proyecto que lleva por nombre “Formulación de una matriz celulolítica sólida y líquida para *Bacillus subtilis* - *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas aeruginosa* como producto mínimo viable para la captación de nutrientes y protección de plantas”, se realizaron diferentes matrices celulolíticas sólidas y líquidas, utilizando tres cepas de bacterias: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *B. megaterium*, las cuales habían sido identificadas tanto como morfológicamente mediante MALDI-TOF, así también como buenos candidatos para su uso como agentes biocontroladores en trabajos anteriores del presente escenario. Dentro de la experimentación se incluyó el uso de suero de leche a manera de hacer uso de un residuo de la industria alimentaria, además de que, para el caso de las matrices líquidas, fueron añadidos a diferentes concentraciones los elementos nitrógeno, fósforo y potasio, esto como estrategia de adicionar compuestos con altas ventas en el mercado agrícola al ser estos los principales nutrientes necesarios para un buen desarrollo de las plantas, y así cubrir ambas necesidades en un solo producto. Para determinar la viabilidad celular de los microorganismos utilizados en contacto con ambas matrices, se realizaron recuentos en placa y así determinar el porcentaje de viabilidad al simular un almacenado de varios días correspondiente a cada uno de los diferentes tratamientos.

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 proyecto actual se basó en la generación de dos principales productos mínimos viables o *MVP's* por sus siglas en inglés (Minimum Viable Product), siendo éstos presentados en la forma de matrices celulolíticas en estado sólido y líquido, involucrando cepas como lo son *B. subtilis*, *B. megatherium*, *P. aeruginosa*, evaluando así su capacidad como agentes de control biológico y bioestimulantes, además de evaluar su viabilidad celular probando distintas metodologías.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

En México, el papel de la agricultura es de suma importancia ya que ésta el área de trabajo de aproximadamente 6 millones de mexicanos, mientras que 21.6 millones de hectáreas encontradas en el territorio nacional se destinan a actividades de este sector (CEDRRSA, 2020). Sin embargo, en el país, aproximadamente entre el 20-30% de la producción agrícola anual se ve afectada por plagas y enfermedades (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018). Por su parte, de acuerdo con Agroasemex, S.A. (2019), las plagas producen pérdidas de hasta un 40% con la relación a la producción agrícola, siendo necesario el uso de insecticidas, fungicidas y nematicidas, así como también fertilizantes químicos, los cuales son una herramienta de gran utilidad en cuanto al rendimiento de los cultivos, aumentando a su vez la producción de alimentos o de crecimiento del producto deseado, aportando nutrientes al suelo y aumentando la concentración de éstos (González, 2019).

No obstante, esta aplicación excesiva produce eutrofización, toxicidad y contaminación de aguas (cambio en el pH, deterioro de la estructura del suelo y de la microfauna) y aire, así como degradación del suelo y desequilibrios biológicos (González, 2019); por esa razón, nace la necesidad del uso de agentes de biocontrol, los cuales involucran estrategias que permitan una agricultura sostenible, evitando así la utilización de plaguicidas con el fin de resaltar la opción más viable y sustentable.

La Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2019), establece que en México existen cuatro métodos aplicables al control biológico, los cuales son inoculación, constituido por la introducción de insectos y ácaros útiles, método clásico que se basa en la liberación de un parasitoide y predador, método inundación, el cual aborda un gran número de organismos y crías de los mismos, y, finalmente, método conservación, siendo éste previo a la preparación del cultivo.

Además de lo previamente mencionado, también existe el uso de microorganismos, los cuales favorecen el desarrollo de las plantas, ayudando en su nutrición, estimulando el sistema inmune, fijando el nitrógeno atmosférico o solubilizando el fósforo, así como en la protección de las mismas ante plagas por medio de un comportamiento antagónico ante fitopatógenos que busquen atacar (Cárdenas *et al.*, 2021).

Existen diversas clasificaciones generadas para este tipo de microorganismos, siendo tales (Cárdenas *et al.*, 2021):

- **Mejoradores:** Aumentan la fertilidad del suelo mediante el mejoramiento de las propiedades físicoquímicas por medio de la formación de agregados.
- **Fito estimulantes:** Permiten la germinación de semillas, producción de vitaminas y frutos, enraizamiento, entre otras características importantes.

- **Biorremediadores:** Degradan insumos agronómicos sintéticos que son perjudiciales para la salud.
- **Biofertilizantes:** Incrementan la disponibilidad de los nutrientes y atacan en presencia de patógenos.

Es por lo descrito, que se desea utilizar matrices, ya sean líquidas o sólidas (microencapsulación) de células por medio de cepas de interés, las cuales ayuden a fomentar la protección de la planta y la captación de nutrientes de la misma, disminuyendo o evitando el uso de fertilizantes.

Los microorganismos del género *Bacillus* (Gram positivas, catalasa positiva y aerobio estricto) han demostrado una gran capacidad para el control biológico, específicamente *B. subtilis* (Figura 1) y *B. megaterium* (Figura 2), las cuales funcionan como agentes de biocontrol en el caso de enfermedades de cultivos agrícolas debido a su aplicación foliar y radicular (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018).

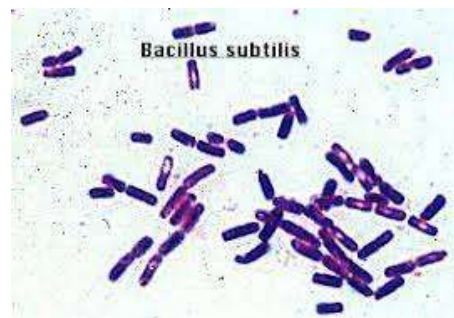


Figura 1. Morfología de *Bacillus subtilis* (López, s.f.).

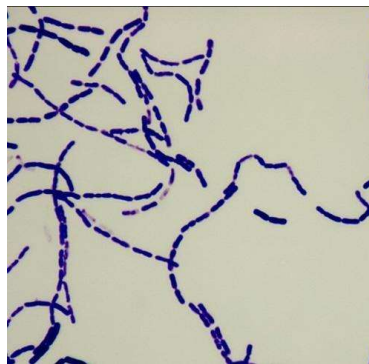


Figura 2. Morfología de *Bacillus megaterium* (Mitushi Biopharma, s.f.).

Además, este género de bacterias tiene la propiedad de producción de endosporas, las cuales pueden sobrevivir en condiciones de cultivos con estrés alto o suelos inhóspitos y, también, pueden asimilar rápidamente nutrientes y secretar enzimas digestoras que degradan y matan hongos y bacterias que afectan a la planta (Control Bío, 2015). Es importante mencionar que este tipo de cepas también permiten la

solubilización del fósforo, lo que promueve el crecimiento vegetal, e inclusive participa en la producción de reguladores de crecimiento (*e.g. indol acético*). Al encontrarse en consorcios, obtiene la capacidad de fijar nitrógeno (Corrales *et al.*, 2016).

La segunda cepa de interés *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 3), es fijadora de nitrógeno y solubilizadora de fósforo, el cual es un constituyente de enzimas, proteínas, ADN y clorofila (González, 2019). Inclusive, se toma en cuenta su producción de biosurfactantes, es decir, moléculas que incrementan la solubilidad en el agua y la disponibilidad de compuestos orgánicos (Becerra & Horna, 2016).

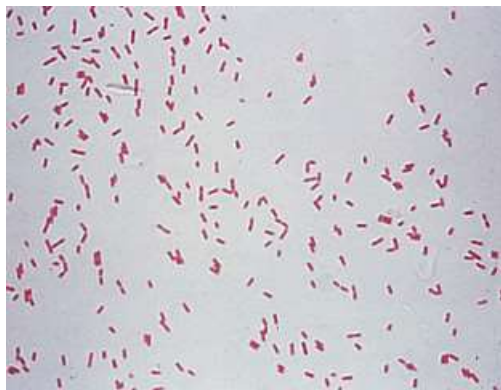


Figura 3. Morfología de *Pseudomonas aeruginosa* (Todar, *s.f.*)

Existen dos diferentes tipos de formulación de matrices, teniendo primeramente las líquidas, las cuales necesitan ser almacenadas y distribuidas bajo temperaturas de refrigeración, a su vez, se distinguen en dos tipos, siendo éstos según su base, es decir, oleosa o acuosa. Por su parte, se cuenta con formulaciones sólidas, las cuales utilizan distintos métodos de secado, teniendo como principio la eliminación de agua, la cual ralentiza el metabolismo de las células, previniendo así, también, la acumulación de productos tóxicos y disminuyendo la desnaturalización de proteínas; para esta última formulación se tienen diferentes métodos como adsorción en turba (material poco uniforme y vida útil de la turba no estéril es limitada), encapsulación, matrices de polisacáridos (pérdida de viabilidad durante almacenamiento), secado por contacto o corriente de aire, entre otros (Yáñez, 2012).

El objetivo del presente proyecto consiste en generar, bajo el concepto de producto mínimo viable, matrices que mantengan la viabilidad por un largo período de tiempo, es decir aumentar la vida útil y de anaquel de los microorganismos, siendo fáciles de manipular y aplicar (Yáñez, 2012).

1.2 Caracterización de la organización o comunidad

La investigación en el ITESO se estructura a través de Programas Formales de Investigación (PFI). El PFI articula el conjunto de líneas y proyectos de investigación del departamento, así como su relación con las labores educativas y de vinculación de la propia dependencia. A su vez, con la interdisciplinariedad como fundamento, promueve la coordinación con las líneas y proyectos de investigación de otras dependencias de la universidad a través de Programas Formales de Investigación (PFI). El objetivo general del Programa Formal de Investigación del Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales se basa en el desarrollo de conocimiento tanto teórico como práctico que permita la interpretación y solución de problemas considerando el aprovechamiento de los recursos naturales y su impacto sobre el medio ambiente y las comunidades, particularmente en el occidente de México.

Las líneas de investigación con sus respectivos objetivos se detallan a continuación:

1. Energía

Desarrollar tecnología para el ahorro y uso eficiente de la energía en procesos productivos que se desarrollan en el occidente de México, empleando enfoques que van desde la organización y administración de procesos hasta el desarrollo de prototipos de equipos eficientes y que permitan ahorrar energía. Desarrollar conocimiento aplicado y tecnología para el aprovechamiento de energías renovables en procesos donde puedan resultar económicas y oportunas y resolver problemas específicos de índole doméstica o productiva, rural o urbana en el occidente de México.

2. Alimentos

Estudiar productos agropecuarios del occidente de México que potencialmente contengan sustancias bioactivas subutilizadas con el objeto de aprovecharlos integralmente. Diseñar y desarrollar alimentos funcionales que, mediante el uso de microorganismos probióticos y sustancias nutracéuticas, contribuyan a la prevención de patologías agudas y crónicas. Desarrollar procesos para el aprovechamiento secundario de materiales que actualmente son residuos de industrias alimentarias con el objeto de generar un mejor rendimiento económico y un menor impacto ambiental. Estudiar las cadenas de abastecimiento de los productos agropecuarios del occidente de México, desde su origen hasta su consumo final, y proponer alternativas viables que ayuden a mejorar su rendimiento económico y disminuir su impacto ambiental.

3. Medio ambiente

Mejorar el conocimiento sobre los servicios de ecosistemas en la región occidente de México y su relación con el bienestar y la salud humana. Desarrollar y aplicar metodologías que permitan entender, cuantificar y prever cambios ambientales acumulativos resultantes de proyectos (planes o programas) hídricos,

urbanos y energéticos. Desarrollar conocimiento aplicado, tecnología y herramientas de gestión para evitar, mitigar o compensar cambios en ecosistemas y sus impactos en comunidades vulnerables y generaciones futuras.

El proyecto PAP de “Biorrefinerías Avanzadas” que forma parte del Programa de Desarrollo Tecnológico para la Sustentabilidad Ambiental, Energética y Alimentaria, integra el escenario de “*Biocontrol*” bajo el cual se desarrolla la presente investigación, contando con la asesoría del Dr. Alejandro Arana Sánchez y el Dr. Luis Segura. Este escenario tiene como finalidad la formulación y desarrollo de un producto mínimo viable (MVP) a partir de matrices celulolíticas en estado sólido y líquido para el mantenimiento celular de microorganismos, específicamente *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas aeruginosa*, con capacidad de agentes biocontroladores, siendo éstos identificados y caracterizados en proyectos PAP anteriores, además de la utilización de suero de leche como fuente tanto de carbono como de nutrientes extra, y, a su vez, como alternativa al uso de residuos de productos alimenticios. Por su parte, inclusive se busca estudiar la acción de los componentes NPK a distintas concentraciones en el caso de cada microorganismo utilizado.

1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

Los plaguicidas, insecticidas, fungicidas y nematocidas tienen como función el contrarlar pagas, no obstante, muchas veces éstos traen consigo repercusiones como degradación de suelos, plagas más resistentes, eutrofización, toxicidad y contaminación de agua y aire, produciendo finalmente un desequilibrio biológico (González, 2019).

De acuerdo con FAO (2018), actualmente se rocía al año en el mundo 4.6 millones de toneladas y 115 millones de fertilizantes nitrogenados. Por lo que, el uso de productos biocontroladores fungen como alternativa amigable ante este tipo de problemáticas.

Para hacer uso de aquellas bacterias biocontroladoras y sacar provecho de sus amplias capacidades en el sector agrícola, es necesaria la formulación de matrices que permitan conservar la viabilidad celular del producto. Sin embargo, previo a esto, se han llevado a cabo múltiples investigaciones que permitieron conocer las características de las cepas utilizadas, siendo probadas en plantas *in vitro* con el fin de conocer si realmente contaban con las características deseadas o no, para, a partir de tal información, escoger cepas aprobadas y comenzar a trabajar con ellas.

1.4. Planeación de alternativa(s)

Debido a la situación que se describió previamente en cuanto al daño recibido a los cultivos por parte de plagas y la necesidad de una herramienta que permita la protección de éstos, siendo al mismo tiempo amigable con el ecosistema, se optó por llevar a cabo productos de biocontrol. Para estos productos se tomó en cuenta la caracterización de cepas y pruebas microbiológicas realizadas en los semestres previos, además de investigar según la literatura, la función de cada una de éstas y así, finalmente, una vez estudiados los microorganismos y técnicas que se pueden utilizar, escoger cuáles se usarían para el proyecto.

Primeramente, se activaron las cepas escogidas, siendo éstas *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas aeruginosa*, tomadas de proyectos PAP previos dado su anterior aislamiento, específicamente por parte de García y Verdugo (2021) a partir del Mezcal, que demostraron capacidad de actuación como agentes biocontroladores, tanto en plantas de berries como en plantas de jitomate (esto en pruebas *in vitro* e *in vivo*). Posteriormente, se estudiaron los tipos de matrices existentes para mejorar la viabilidad celular del producto, seleccionando, consecuentemente, una de tipo sólida y otra líquida, con el fin de observar la diferencia en la viabilidad celular de cada una y, concluir si, según lo observado en otras fuentes, la matriz celulolítica sólida permite una vida de anaquel más larga. A continuación, se observa el plan de trabajo seguido durante la realización del Proyecto.

Planeación general PAP BIOCONTROL O22- Equipo Ximena & Lizbeth

Se llevará a cabo el desarrollo experimental durante el ciclo escolar otoño 2022 que comprende desde el 15 de agosto finalizando el 5 de diciembre de 2022. En el siguiente gráfico, se muestra la planeación seguida hasta la fecha, además de los días que comprendió dicha actividad.



Figura 4. Diagrama de Gantt de planeación del proyecto

1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

Para llevar a cabo la experimentación, se utilizaron dos tipos diferentes de matrices, líquida y sólida. Para *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium*, se suspendieron en medio MRS; mientras que para *Pseudomonas aeruginosa* se utilizó medio YPD. A las matrices líquidas se les añadió NPK (nitrógeno-fósforo-potasio) a diferentes concentraciones para observar qué tanto mejora la viabilidad celular de las cepas, según las características que éstas tienen. Por su parte, para la microencapsulación se crearon esferas por medio de alginato y calcio.

Para mejorar las matrices utilizadas, se pensó en hacer uso de residuos de productos alimenticios como fuente adicional de nutrientes o de carbono, tales como:

- **Escobajos de uva** a partir de residuos dentro de la producción vino, el cual contiene nutrientes y compuestos polifenólicos extraíbles (e.g. ácidos fenólicos) (Issuu, s.f.).
- **Bagazo de cebada** procedente de industrias cerveceras, el cual es utilizado como fertilizante, conteniendo proteína y fibra alimentaria, además de polifenoles y antioxidantes (Torrente, 2019).
- **Suero de leche**, el cual contiene agua, lactosa, proteína cruda, minerales, grasa, ácido láctico y

vitaminas hidrosolubles, siendo una fuente de carbono perfecta para el microorganismo. Esta tercera opción fue la utilizada para el proyecto, debido a su alta fuente de carbono, así como que no se encontraron patentes que hicieran uso de los mismos elementos y del mismo fin del producto (**Anexos**).

1. Preparación de medios de cultivo

Se utilizaron dos medios de cultivo diferentes, uno para las cepas de *Bacillus* y el otro para la cepa *Pseudomonas*:

- **Medio MRS (Para *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium*)**

Se prepararon 2 L de medio MRS compuesto de 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de extracto de carne, 20 g de glucosa, 2 g de fosfato de potasio, 5 g acetato de sodio, 0.2 g de sulfato de magnesio, 0.05 g de sulfato de magnesio, 1.08 g de polisorbato 80 y 2 g de citrato de amonio (NEOGEN, s.f).

- **YPD (Para *Pseudomonas aeruginosa*)**

Se prepararon 2 L de caldo YPD compuesto de 20 g de peptona bacteriológica, 20 g de glucosa, 10 g de extracto de levadura (Sigma-Aldrich, s.f.).

2. Descongelación y activación de cepas criopreservadas

Debido a que las cepas se encuentran a -18°C , se disminuyó la temperatura hasta alcanzar los 4°C . Una vez a temperatura ambiente se realizó la inoculación en los medios propios para cada cepa y se incubaron en las condiciones óptimas para su crecimiento, es decir, 37°C .

3. Medición de biomasa

Se colocaron 200 μL de muestra en pocillo de microplaca, con el fin de medir densidad óptica a 600nm, con el fin de determinar mediante razonamiento propio el número de diluciones a llevar a cabo.

4. Control de esterilidad

Se realizó un conteo celular al microscopio para evaluar el correcto crecimiento de las diferentes cepas en sus medios correspondientes (Figura 5 y 6).

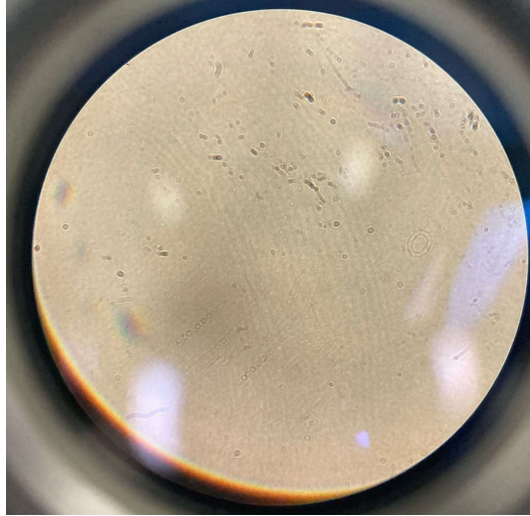


Figura 5. Bacillus Megaterium al microscopio.

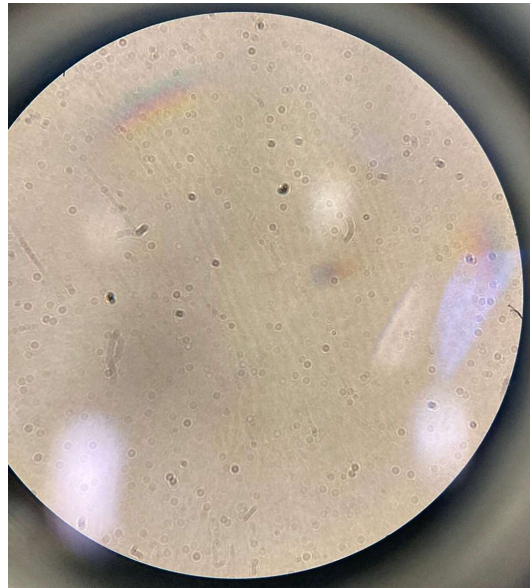


Figura 6. Bacillus subtilis al microscopio.

5. Reposición de crioviales

Se tomó una muestra del inóculo en crecimiento en fase exponencial, cuidando que provenga de cultivos no contaminados y además hayan sido cuidados adecuadamente. Utilizando glicerol estéril, en autoclave, como agente criopreservante se preparó una mezcla 1:1 de medio con inóculo más glicerol (500 μ L de ambos), se resuspendió dicha mezcla y se agitó por medio de vórtex por algunos segundos para después ser sometida a ultracongelación a -18°C (García & Uruburu, s.f). Finalmente, en algunos crioviales se llevó a una congelación gradual hasta -87°C (Figura 7).



Figura 7. Reposición de crioviales.

6. Microencapsulado utilizando alginato

A manera de tener una referencia de comparación de microencapsulado se utilizó la técnica proporcionada por el Dr. Luis Segura para la inmovilización de levaduras, recalando que, para esta ronda de experimentos, se utilizaron bacterias. La técnica consistió en realizar encapsulaciones por medio de alginato al 3% mezclado con el medio ya inoculado, en una relación de 2.5 mL de medio por cada 10 mL de alginato, de acuerdo a lo propuesto por Meftah *et al.* (2020). Esta mezcla fue gelificada mediante una solución de cloruro de calcio al 150 mM. Lo descrito se llevó a cabo por medio de una bomba peristáltica y una aguja 21G X1 ¼", tal como se muestra en la siguiente representación gráfica (Figura 8), donde del lado derecho se observa el tubo que contenía la muestra medio-alginato, y del lado izquierdo la aguja, teniendo un vaso de precipitados debajo de ésta con CaCl₂.



Figura 8. Descripción gráfica del proceso llevado a cabo para la producción de microencapsulaciones.

Posteriormente, para el almacenamiento se siguieron dos tipos, primeramente, el almacenamiento propuesto por el Doctor Luis Segura, en el cual las microencapsulaciones se almacenaron en una solución de glucosa al 4% en refrigeración (4°C) (Figura 9).



Figura 9. Matriz sólida almacenada en glucosa (4%) y a 4°C.

Y, la segunda propuesta que, de acuerdo con García y Uruburu (s.f.), las muestras pueden ser almacenadas de 4 a 18°C, sin luz, por lo que se almacenaron unas en refrigeración y otras a temperatura ambiente, ambas cubiertas con aluminio (Figura 10 y 11).



Figura 10. Matriz sólida almacenada a 4°C sin luz.



Figura 11. Matriz sólida almacenada a temperatura ambiente sin luz.

7. Microencapsulado utilizando alginato más suero de leche

Se siguió la técnica expuesta en el punto 5, añadiendo, a su vez, suero de leche, relacionando que, por lo general, es necesario 2 g/L de glucosa, por lo que, el suero de leche al tener un 70% de lactosa, se necesita el 200% de ésta, obteniendo finalmente una relación de 5.7 g/L a agregar de suero de leche.

8. Formulación de matriz líquida

Se realizó una mezcla del medio de cultivo previamente inoculado, utilizando NPK a distintas concentraciones y glicerol como solución estabilizadora (Navarro, 2021). Es importante recalcar que, al no contar con nitrógeno, fósforo y potasio por sí solos, se utilizaron sales, siendo éstas cloruro de potasio, fosfato de sodio monobásico y urea; teniendo las siguientes corridas mostradas en la Tabla 1. Finalmente, los 9 tubos se almacenaron a 4°C (Figura 12).



Figura 12. Matrices líquidas con NPK.

Tabla 1. Corridas de las matrices líquidas.

Volumen total	Nitrógeno	Fósforo	Potasio	Medio inoculado	Glicerol
15 mL	6%	4%	4%	43%	43%
	10%	10%	10%	35.5%	35.5%
	0%	30%	0%	35%	35%
	7%	0%	0%	46.5%	46.5%
	20%	20%	20%	20%	20%
	0%	20%	20%	30%	30%
	20%	0%	20%	30%	30%
	17%	17%	17%	27.5%	27.5%
15 mL (CONTROL)	0%	0%	0%	50%	50%

9. Formulación de matriz líquida con suero de leche

A los caldos de cultivos propuestos se les añadió suero de leche (5.7 g/L)

10. Medición de viabilidad celular

Se inoculó en placa Petri y se realizó el conteo pertinente. Por su parte, en el caso de las encapsulaciones

con alginato, se tomó 0.5 g en 1 mL de citrato de sodio y se mezcló con ayuda de un vortex hasta disolver las perlas. Esta solución obtenida se sembró en cajas Petri, utilizando 100 μ L y esparciendo con asa en L o varilla de vidrio, según el medio requerido para cada cepa y, a su vez, se realizó una dilución de 10^3 y 10^6 para cada muestra.







Para las matrices líquidas, se tomaron 100 μ L de muestra y se sembró en cajas Petri, siguiendo las mismas diluciones y procedimientos que para las microencapsulaciones.









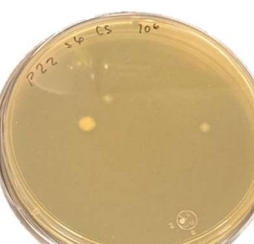
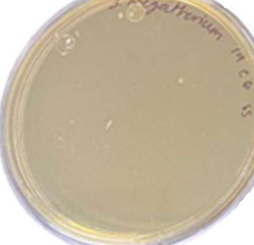

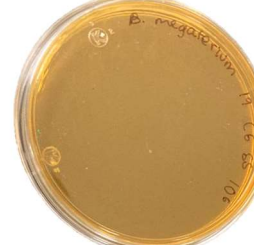



1.6. Valoración de productos, resultados e impactos






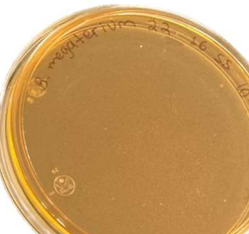
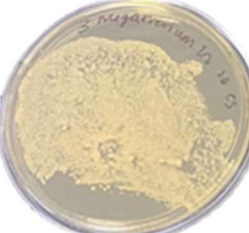







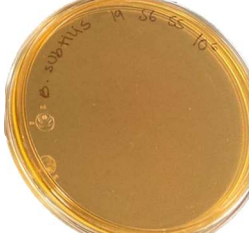
A continuación, en la siguiente Tabla 2, se aprecian los resultados obtenidos a partir del análisis de viabilidad celular de los productos elaborados. Este procedimiento se llevó a cabo como se describe anteriormente, haciendo uso de cajas Petri que contenían el agar predilecto para cada cepa, es decir, MRS agar para *Bacillus spp.*, y YPD agar para *Pseudomonas aeruginosa*.








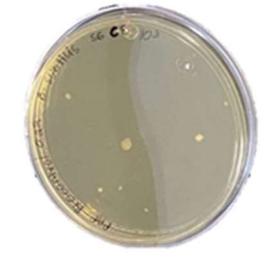

Las evidencias mostradas fueron analizadas transcurridas 3 semanas desde la producción, realizando a su vez las diluciones pertinentes y siendo incubadas por 18-20 horas aproximadamente.

Tabla 2. Viabilidad celular en microencapsulación pasadas 3 semanas.

Producto	Sin dilución	10^3	10^6
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • Glucosa: SÍ • Suero: NO • Almacenamiento: Temperatura ambiente 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • Glucosa: NO • Suero: NO • Almacenamiento: Temperatura ambiente 			

<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • Glucosa: SÍ • Suero: NO • Almacenamiento: 4°C 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • Glucosa: NO • Suero: NO • Almacenamiento: 4°C 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • Glucosa: NO • Suero: SÍ • Almacenamiento: 4°C 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Bacillus megaterium</i> • Glucosa: SÍ • Suero: NO • Almacenamiento: Temperatura ambiente 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Bacillus megaterium</i> • Glucosa: NO • Suero: NO • Almacenamiento: Temperatura ambiente 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Bacillus megaterium</i> • Glucosa: SÍ 			

<ul style="list-style-type: none"> • Suero: NO • Almacenamiento: 4°C 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Bacillus megaterium</i> • Glucosa: NO • Suero: NO • Almacenamiento: 4°C 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Bacillus megaterium</i> • Glucosa: NO • Suero: SÍ • Almacenamiento: 4°C 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Bacillus subtilis</i> • Glucosa: SÍ • Suero: NO • Almacenamiento: Temperatura ambiente 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Bacillus subtilis</i> • Glucosa: NO • Suero: NO • Almacenamiento: Temperatura ambiente 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Bacillus</i> 			

<p><i>subtilis</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Glucosa: SÍ • Suero: NO • Almacenamiento: 4°C 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Bacillus subtilis</i> • Glucosa: NO • Suero: NO • Almacenamiento: 4°C 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Bacillus subtilis</i> • Glucosa: NO • Suero: SÍ • Almacenamiento: 4°C 			



















Gracias a los resultados obtenidos, se pudo observar que a las 3 semanas a temperatura ambiente el producto sigue siendo viable, lo que facilita su uso al no necesitar refrigeración, siendo así más accesible. De igual manera, se observó también un mayor crecimiento en aquellas cepas que no fueron almacenadas en glucosa al 4%, obteniendo así una idea de que, probablemente, el almacenamiento en glucosa pudiera causar inhibición que afecta el crecimiento de las mismas, al tener una sobresaturación del sustrato.













Por su parte, es posible observar que la adición de suero, a diferencia de la glucosa, no inhibe el crecimiento, mientras que por su parte permite que éste sea más controlado.

Posteriormente, se realizó el análisis de viabilidad celular pasadas 6 semanas desde la producción, realizando a su vez las diluciones pertinentes y siendo incubadas por 18-20 horas aproximadamente.

Tabla 3. Viabilidad celular en microencapsulación pasadas 6 semanas

Producto	Sin dilución	10^3	10^6
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • Glucosa: SÍ • Suero: NO • Almacenamiento: Temperatura ambiente 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • Glucosa: NO • Suero: NO • Almacenamiento: Temperatura ambiente 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • Glucosa: SÍ • Suero: NO • Almacenamiento: 4°C 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • Glucosa: NO • Suero: NO • Almacenamiento: 4°C 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • Glucosa: NO • Suero: SÍ • Almacenamiento: 4°C 			

<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Bacillus megaterium</i> • Glucosa: SÍ • Suero: NO • Almacenamiento: Temperatura ambiente 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Bacillus megaterium</i> • Glucosa: NO • Suero: NO • Almacenamiento: Temperatura ambiente 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Bacillus megaterium</i> • Glucosa: SÍ • Suero: NO • Almacenamiento: 4°C 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Bacillus megaterium</i> • Glucosa: NO • Suero: NO • Almacenamiento: 4°C 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Bacillus megaterium</i> • Glucosa: NO • Suero: SÍ • Almacenamiento: 4°C 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Bacillus subtilis</i> • Glucosa: SÍ • Suero: NO • Almacenamiento: Temperatura ambiente 			

<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Bacillus subtilis</i> • Glucosa: NO • Suero: NO • Almacenamiento: Temperatura ambiente 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Bacillus subtilis</i> • Glucosa: SÍ • Suero: NO • Almacenamiento: 4°C 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Bacillus subtilis</i> • Glucosa: NO • Suero: NO • Almacenamiento: 4°C 			
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa: <i>Bacillus subtilis</i> • Glucosa: NO • Suero: SÍ • Almacenamiento: 4°C 			

Es posible observar la misma relación descrita a las 3 semanas, siendo tal que a existe un mayor crecimiento en aquellas cepas que no fueron almacenadas en glucosa al 4%, no obstante, se puede ver más crecimiento que antes en aquellas a las que se les añadió suero de leche, pudiendo ser que, debido a que la lactosa no se hidrolizó, les tomó más tiempo captar el carbohidrato requerido (glucosa), sin embargo, sí lo están aceptando.













Por su parte, es rescatable mencionar que el crecimiento obtenido fue mayor a las 6 semanas en comparación del primer análisis de viabilidad celular llevado a cabo, lo que puede deberse a un mal tratamiento al momento de romper las microencapsulaciones de alginato, ya que éstas tomaban su tiempo y, es posible que no se haya liberado su contenido en la primera experimentación, debiéndose a su vez al



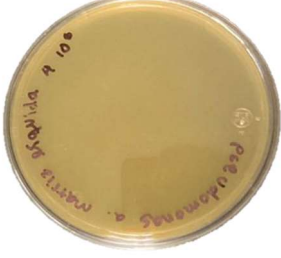












poco conocimiento que se tenía, siendo la primera vez que se realizaba tal procedimiento.









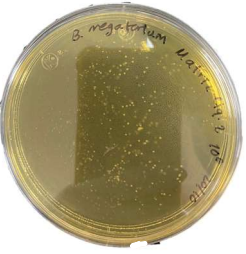




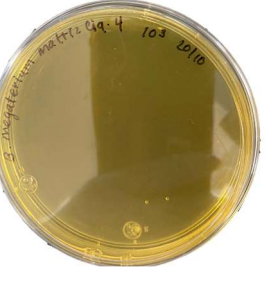

A su vez, se puede observar que no se encuentra una diferencia notoria entre el almacenamiento en refrigeración y aquellos productos a temperatura ambiente.


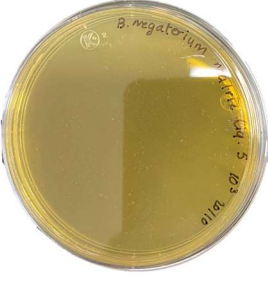











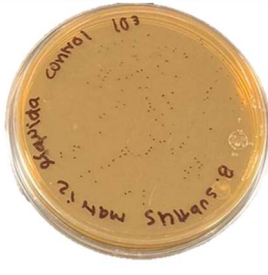

En cuanto a las matrices líquidas, se obtiene la siguiente Tabla 4, pasadas las 3 semanas:
















Tabla 4. Viabilidad celular en matrices líquidas pasadas 3 semanas

Producto	Sin dilución	10 ³	10 ⁶
Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NPK (%): 0-0-0			
Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NPK (%): 6-4-4			
Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NPK (%): 10-10-10			
Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NPK (%): 0-30-0			

<p>Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>NPK (%): 7-0-0</p>			
<p>Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>NPK (%): 20-20-20</p>			
<p>Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>NPK (%): 0-20-20</p>			
<p>Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>NPK (%): 20-0-20</p>			
<p>Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>NPK (%): 17-17-17</p>			

<p>Cepa: <i>Bacillus megaterium</i></p> <p>NPK (%): 0-0-0</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus megaterium</i></p> <p>NPK (%): 6-4-4</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus megaterium</i></p> <p>NPK (%): 10-10-10</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus megaterium</i></p> <p>NPK (%): 0-30-0</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus megaterium</i></p> <p>NPK (%): 7-0-0</p>			

<p>Cepa: <i>Bacillus megaterium</i></p> <p>NPK (%): 20-20-20</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus megaterium</i></p> <p>NPK (%): 0-20-20</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus megaterium</i></p> <p>NPK (%): 20-0-20</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus megaterium</i></p> <p>NPK (%): 17-17-17</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus subtilis</i></p> <p>NPK (%): 0-0-0</p>			

<p>Cepa: <i>Bacillus subtilis</i></p> <p>NPK (%): 6-4-4</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus subtilis</i></p> <p>NPK (%): 10-10-10</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus subtilis</i></p> <p>NPK (%): 0-30-0</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus subtilis</i></p> <p>NPK (%): 7-0-0</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus subtilis</i></p> <p>NPK (%): 20-20-20</p>			
















Cepa: <i>Bacillus subtilis</i> NPK (%): 0-20-20			
Cepa: <i>Bacillus subtilis</i> NPK (%): 20-0-20			
Cepa: <i>Bacillus subtilis</i> NPK (%): 17-17-17			
















A partir de la Tabla anterior se puede observar que *Pseudomonas aeruginosa* obtuvo un mayor crecimiento en aquellas con mayor contenido de fósforo, así como en las balanceadas. Por su parte, tanto *Bacillus Subtilis*, como *Bacillus megaterium*, crecieron más en aquellos que tenían un contenido importante de nitrógeno, así como también en aquellas que tenían composición equilibrada

Por su parte, a las 6 semanas, se obtuvieron los siguientes resultados:
















Tabla 5. Viabilidad celular en matrices líquidas pasadas 6 semanas
















Producto	Sin dilución	10^3	10^6
Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NPK (%): 0-0-0			

<p>Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>NPK (%): 6-4-4</p>			
<p>Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>NPK (%): 10-10-10</p>			
<p>Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>NPK (%): 0-30-0</p>			
<p>Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>NPK (%): 7-0-0</p>			
<p>Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>NPK (%): 20-20-20</p>			

<p>Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>NPK (%): 0-20-20</p>			
<p>Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>NPK (%): 20-0-20</p>			
<p>Cepa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>NPK (%): 17-17-17</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus megaterium</i></p> <p>NPK (%): 0-0-0</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus megaterium</i></p> <p>NPK (%): 6-4-4</p>			

<p>Cepa: <i>Bacillus megaterium</i></p> <p>NPK (%): 10-10-10</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus megaterium</i></p> <p>NPK (%): 0-30-0</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus megaterium</i></p> <p>NPK (%): 7-0-0</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus megaterium</i></p> <p>NPK (%): 20-20-20</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus megaterium</i></p> <p>NPK (%): 0-20-20</p>			

<p>Cepa: <i>Bacillus megaterium</i></p> <p>NPK (%): 20-0-20</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus megaterium</i></p> <p>NPK (%): 17-17-17</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus subtilis</i></p> <p>NPK (%): 0-0-0</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus subtilis</i></p> <p>NPK (%): 6-4-4</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus subtilis</i></p> <p>NPK (%): 10-10-10</p>			

<p>Cepa: <i>Bacillus subtilis</i></p> <p>NPK (%): 0-30-0</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus subtilis</i></p> <p>NPK (%): 7-0-0</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus subtilis</i></p> <p>NPK (%): 20-20-20</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus subtilis</i></p> <p>NPK (%): 0-20-20</p>			
<p>Cepa: <i>Bacillus subtilis</i></p> <p>NPK (%): 20-0-20</p>			



Al comparar las semanas 3 y 6, se puede observar que existió un mayor crecimiento en este segundo análisis, pudiendo deberse tal vez a la posible asimilación tardía de la lactosa, convirtiéndola posteriormente en glucosa y, concluyendo entonces que, cualquier tratamiento es apto debido a la presencia de suero de leche como carbohidrato agregado al medio.

Es recalable mencionar que, debido a la nula información arrojada por parte del conteo inicial, es decir, las cajas Petri inoculadas sin ningún tratamiento, el análisis y diseño de experimentos se encuentra descrito por completo en Anexos 1.8.5.

No obstante, a continuación, abordaremos las tablas de estos mismos resultados, resumiendo los valores de interés con el fin de demostrar y culminar con la discusión de los mismos, estableciendo que no existió una diferencia estadística en la viabilidad con respecto al tratamiento aplicado en ambos casos. Se recalca a su vez que para llevar a cabo esto se utilizó *MiniTab*, basándose en una prueba de *Tukey*, y teniendo como factor los tratamientos y la respuesta el conteo celular (UFC/mL).

Por su parte, existió una mejor respuesta en las matrices líquidas, sin embargo, en las sólidas se obtuvo que la adición de suero era mejor que la de glucosa como fuente de carbono extra.

Tabla 6. Diferentes valores de *P* obtenidos para cada microorganismo utilizado en matrices sólidas.

Microorganismo	Tratamientos	<i>P-values</i>	
		Semana 3	Semana 6
<i>B. subtilis</i>	SG/SS	0.324	0.258
	SG/CS		
	CG/SS		
<i>B. megaterium</i>	SG/SS	0.145	0.796
	SG/CS		
	CG/SS		
	SG/SS		

<i>P. aeruginosa</i>	SG/CS	0.296	0.657
	CG/SS		

Tabla 7. Diferentes valores de P obtenidos para cada microorganismo utilizado en matrices líquidas.

Microorganismo	No. Matrices comparadas	P-values	
		Semana 3	Semana 6
<i>B. subtilis</i>	8	0.973	0.629
<i>B. megaterium</i>	8	0.969	0.978
<i>P. aeruginosa</i>	8	0.817	0.996

Debido a que se contaba con la información de la semana 3 y la semana 6, se llevó a cabo una prueba Tukey que permitió reconocer que la dilución 10^6 , en cuanto UFC/mL, era la más alta, en comparación con el control y la dilución 10^3 , siendo éstos iguales (Figura 13 y 14). Por tanto, se plantea la posibilidad de realizar un diseño de experimento tomando como control la dilución 10^6 de la semana 3, es decir el 100% de viabilidad celular, en cuanto a las matrices líquidas.

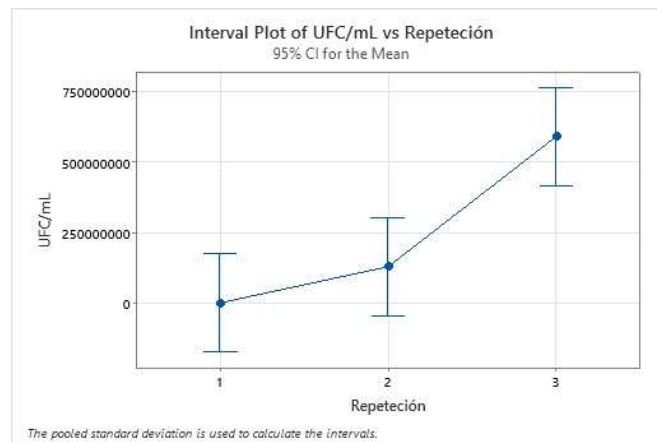


Figura 13. Prueba Tukey para las diluciones en matrices líquidas.

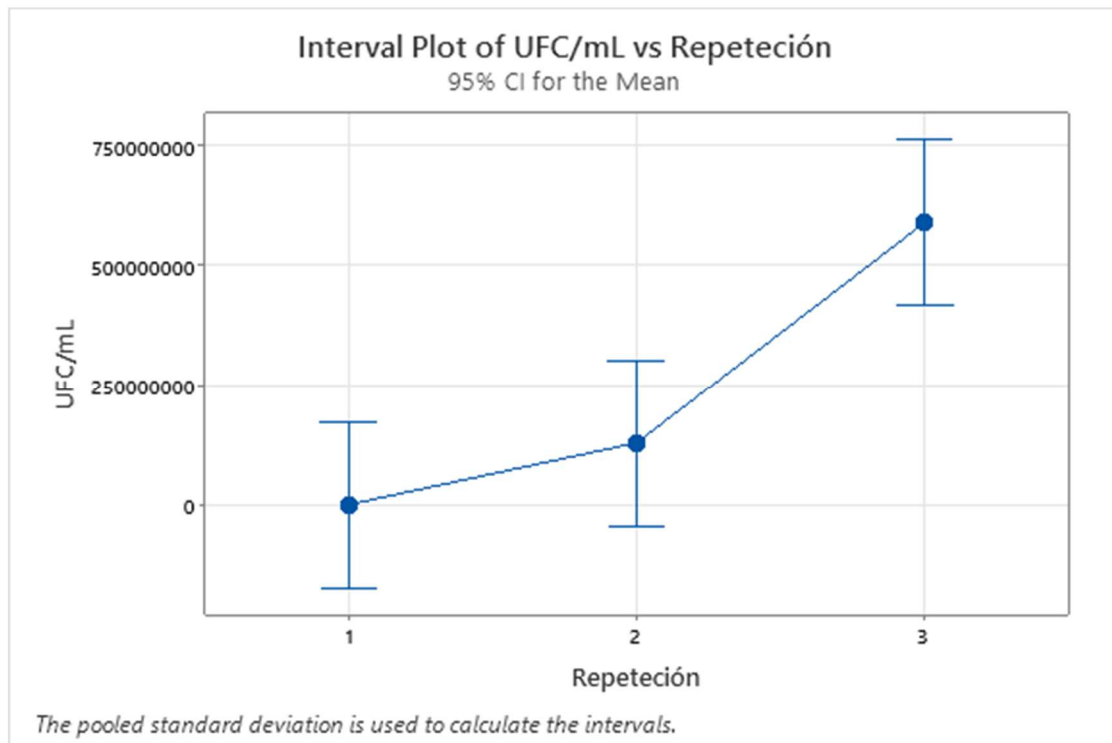
Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Repetición	2	3.45864E+18	1.72932E+18	12.95	0.000
Error	51	6.80898E+18	1.33510E+17		
Total	53	1.02676E+19			

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Repetición	N	Mean	Grouping
3	18	589444444	A
2	18	128478889	B
1	18	1077	B

Means that do not share a letter are significantly different.



Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Repetición	2	3.45864E+18	1.72932E+18	12.95	0.000
Error	51	6.80898E+18	1.33510E+17		
Total	53	1.02676E+19			

Figura 14. Análisis de varianza para las diluciones en matrices líquidas.

Con respecto a las matrices sólidas se puede realizar lo mismo que lo planteado con anterioridad para las líquidas (Figuras 15 y 16).

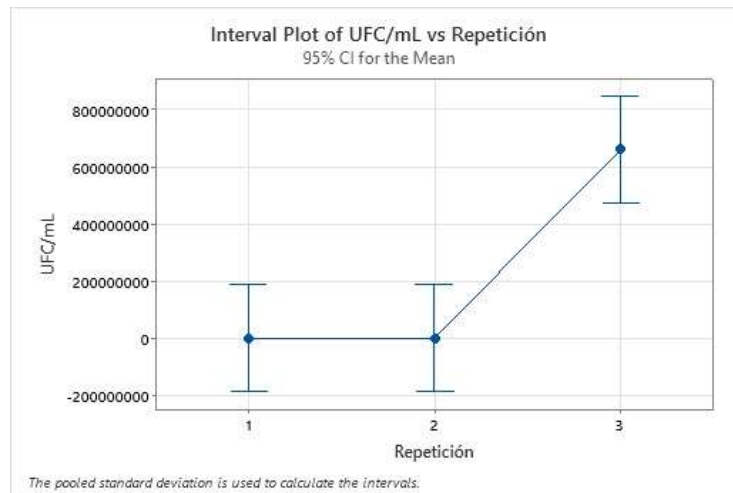


Figura 15. Prueba Tukey para las diluciones en matrices líquidas.

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Repetición	2	8.67691E+18	4.33845E+18	16.49	0.000
Error	87	2.28939E+19	2.63148E+17		
Total	89	3.15708E+19			

Figura 16. Análisis de varianza para las diluciones en matrices sólidas.

1.7. Bibliografía y otros recursos

- Agroasemex, S.A. (2019). “Las plagas producen pérdidas de hasta 40 por ciento en la producción agrícola, revela estudio de la FAO”. Gobierno de México. Recuperado el 09/10/2022 desde: <https://www.gob.mx/agroasemex/articulos/las-plagas-producen-perdidas-de-hasta-un-40-por-ciento-en-la-produccion-agricola-revela-estudio-de-la-fao>
- Becerra, L. & Horna, M.V. (2016). “Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos contaminados con hidrocarburos”. Scientia Agropecuaria, Vol. 7, No. 1. Recuperado el 28/08/2022 desde: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172016000100003
- Cárdenas, C., Molina, L., Cancino, G., De los Santos, S., Anaya, E., Díaz, I. & Ramírez, S. (2021). “Utilización de microorganismos para una agricultura sostenible en México: consideraciones y retos”. Revista mexicana de ciencias agrícolas. 12(5). 899-913
- CEDRRSA. (2020). “Situación del sector agropecuario en México”. CEDRRSA. Recuperado el 28/08/2022 desde: http://www.cedrrsa.gob.mx/files/b/13/22Situacion_Sector_Agropecuario_Me%CC%81xico.pdf
- Cobb. (s.f.). “Control de viabilidad celular”. Cobb. Recuperado el 29/08/2022 desde:

<https://www.asav.es/wp-content/uploads/2016/05/Taller-3-ControldeViabilidadcelular-Jorge-Munoz-Juan-Carlos-Abad.pdf>

- Condalab. (2019). “*Caldo Asparagina*”. Condalab. Recuperado el 28/08/2022 desde: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjC8b-H1er5AhWQLkQIHTSzCfGQFnoECC0QAQ&url=https%3a%2F%2Fwww.condalab.com%2Fint%2Fen%2Findex.php%3Fcontroller%3Dattachment%26id_attachment%3D19787&usg=AOvVaw1eDC2hNPla7w7RBt5oe2SU
- Control Bío. (2015). “*Uso de Bacillus subtilis como biofungicida en agricultura y jardinería*”. Control Bío. Recuperado el 28/08/2022 desde: https://controlbio.es/es/blog/c/76_uso-de-bacillus-subtilis-como-biofungicida-en-agricultura-y-jardineria.html
- Corrales, L., Caycedo, L., Gómez, M.A., Ramons, S.J., Rodríguez, J. (2017). “*Bacillus spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos*”. NOVA, 15 (27), pp. 45-65. Recuperado el 12/10/2022 desde: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v15n27/1794-2470-nova-15-27-00046.pdf>
- FAO. (2018). “*Los contaminantes agrícolas: una grave amenaza para el agua del planeta*”. FAO. Recuperado el 28/08/2022 desde: <https://www.fao.org/news/story/es/item/1141818/icode/>
- García, M., Uruburu, F. (s.f). “*La conservación de cepas microbianas*”, Universitat de Valencia, Recuperado el 30/08/2022 desde: https://www.uv.es/cect2/87_Conseccion_cepas_microbianas
- González, P. (2019). “*Consecuencias ambientales de la aplicación de fertilizantes*”. Biblioteca del Congreso Nacional de Chile (BCN). Recuperado el 28/08/2022 desde: https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/27059/1/Consecuencias_ambientales_de_la_aplicacion_de_fertilizantes.pdf
- Issuu. (s.f.). “*Residuos y subproductos de la industria vitivinícola*”. Issuu. Recuperado el 28/08/2022 desde: https://issuu.com/citeagroindustrialica/docs/in-18-008_informe_valorizaci_n_residuos_ind._vitiv/s/10769199
- López, S. (s.f.). “*Bacillus un género que alberga especies que cumplen diversos roles biológicos*”. UNLP. Recuperado el 11/10/2022 desde: https://inta.gob.ar/sites/default/files/lic_lopez_bacillus.pdf
- Meftah, I., Mernissi, N., Azaroual, S., Mehdi, M., Kacem, A., Bouhfid, R. (2020). “*Bioformulation of microbial fertilizer based on clay and alginate encapsulation*”. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02262-2>
- Mitushi Biopharma. (s.f.). “*Bacillus megatherium*”. Mitushi Biopharma. Recuperado el 11/20/2022 desde: <https://www.mitushibiopharma.com/bacillus-megatherium-7225529.html>
- Navarro, M. (2021). “*Desarrollo, estabilidad y eficacia de biofertilizantes para la mejora del cultivo de plantas de tomate y maíz*”. Universitat de Barcelona. Recuperado el 28/08/2022 desde: https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/674013/MNA_TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed

- =y
- NEOGEN. (s.f.). “*Lactobacilli MRS Broth*”. NEOGEN. Recuperado el 28/08/2022 desde: <https://www.neogen.com/es/categories/microbiology/lactobacilli-mrs-broth/>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2019). “*México potencia en control biológico de plagas*”. Gobierno de México. Recuperado el 09/10/2022 desde: <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/mexico-potencia-en-control-biologico-de-plagas?idiom=es>
- Segura, L. (2016). “Caracterización de levaduras no-Saccharomyces para la producción de tequila con un perfil aromático específico”. CIATEJ. Recuperado el 02/09/2022 desde: <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1023/371>
- Sigma-Aldrich. (s.f.). “*YPD Agar*”. Merck. Recuperado el 29/08/2022 desde: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sial/y1500>
- ThermoFisher Scientific (2022). “*LB Broth Base, poder (Lennox L Broth Base)*”, Recuperado el 29/08/2022 desde: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/technical-resources/media-formulation.136.html>
- Todar, K. (s.f.). “*Pseudomonas aeruginosa*”. Todar’s online textbook of bacteriology. Recuperado el 11/10/2022 desde: <https://www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>
- Torrente, S. (2019). “*Aprovechamiento de los subproductos generados en la industria cervecera*”. Universidad Complutense. Recuperado el 28/08/2022 desde: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/SANDRA%20ESTEBAN%20TORRENTE.pdf>
- Vargas, J.D. (2018). “*Diseño y optimización de un medio de cultivo para la producción de esporas de Bacillus sp.*”. Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá. Recuperado el 28/08/2022 desde: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/35019/Tesis%20pregrado%20Juan%20David%20Vargas%20Mendoza%202018.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- Villarreal-Delgado, M.F., Villa, E., Cira, L.A., Estrada-Alvarado, M., Parra, F., de los Santos-Villalobos, S. (2018). “*El género Bacillus como aganete de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola*”. Revista mexicana de fitopatología, Vol. 36, No.1. Recuperado el 28/08/2022 desde: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092018000100095
- Yáñez, V. (2012). “*Potencial de la cepa CPA-8 de Bacillus subtilis como agente de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta*”. Universitat de Lleida. Recuperado el 28/08/2022 desde: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/80456/Tvrym1de1.pdf>

1.8. Anexos

1.8.1. CONTEO Y VIABILIDAD CELULAR – MICROENCAPSULACIONES

Semana 3

Tabla 8. Conteo en microencapsulaciones semana 3, SIN dilución.

Producto	CFU	Comentarios extras
P19 CG SS	Incontable	
P19 SG SS	Incontable	
P22 CG SS	Incontable	
P22 SG SS	Incontable	
P22 SG CS	180	180 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí
M19 CG SS	0	
M19 SG SS	Incontable	
M22 CG SS	78	78 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí
M22 SG SS	Incontable	
M22 SG CS	Incontable	
S19 CG SS	Incontable	
S19 SG SS	Incontable	
S22 CG SS	54	54 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí
S22 SG SS	Incontable	
S22 SG CS	Incontable	

Tabla 9. Conteo en microencapsulación semana 3, dilución 10^3 .

Producto (10^3)	CFU	Comentarios extras
P19 CG SS	5	
P19 SG SS	Incontable	
P22 CG SS	6	
P22 SG SS	24	

P22 SG CS	10	
M19 CG SS	0	
M19 SG SS	Incontable	
M22 CG SS	12	
M22 SG SS	34	
M22 SG CS	143	
S19 CG SS	6	
S19 SG SS	Incontable	
S22 CG SS	32	32 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí
S22 SG SS	36	36 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí
S22 SG CS	28	28 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí

Tabla 10. Conteo en microencapsulación semana 3, dilución 10^6 .

Producto (10^6)	CFU	Comentarios extras
P19 CG SS	3	
P19 SG SS	38	38 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí
P22 CG SS	2	
P22 SG SS	24	
P22 SG CS	4	
M19 CG SS	0	
M19 SG SS	1	
M22 CG SS	0	
M22 SG SS	7	
M22 SG CS	80	

S19 CG SS	0	
S19 SG SS	1	
S22 CG SS	0	
S22 SG SS	4	
S22 SG CS	0	

Semana 6

Tabla 11. Conteo en microencapsulaciones semana 6, SIN dilución.

Producto	CFU	Comentarios extras
P19 CG SS	Incontable	
P19 SG SS	Incontable	51 individuales, sin embargo, la caja Petri se encuentra cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable
P22 CG SS	Incontable	47 individuales, sin embargo, la caja Petri se encuentra cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable
P22 SG SS	Incontable	
P22 SG CS	Incontable	
M19 CG SS	424	
M19 SG SS	Incontable	
M22 CG SS	Incontable	
M22 SG SS	Incontable	
M22 SG CS	Incontable	
S19 CG SS	Incontable	93 individuales, sin embargo, la caja Petri se encuentra cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable
S19 SG SS	Incontable	200 individuales, sin embargo, la caja Petri se encuentra

		cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable
S22 CG SS	Incontable	29 individuales, sin embargo, la caja Petri se encuentra cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable
S22 SG SS	Incontable	296 individuales, sin embargo, la caja Petri se encuentra cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable
S22 SG CS	Incontable	87 individuales, sin embargo, la caja Petri se encuentra cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable

Tabla 12. Cuento en microencapsulaciones semana 6, dilución 10^3 .

Producto (10^3)	CFU	Comentarios extras
P19 CG SS	150	
P19 SG SS	86	86 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí
P22 CG SS	30	
P22 SG SS	Incontable	
P22 SG CS	Incontable	
M19 CG SS	181	
M19 SG SS	Incontable	125 individuales, sin embargo, la caja Petri se encuentra cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable
M22 CG SS	33	
M22 SG SS	Incontable	

M22 SG CS	Incontable	94 individuales, sin embargo, la caja Petri se encuentra cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable
S19 CG SS	61	61 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí
S19 SG SS	240	
S22 CG SS	Incontable	
S22 SG SS	Incontable	
S22 SG CS	40	40 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí

Tabla 13. Conteo en microencapsulaciones semana 6, dilución 10^6 .

Producto (10^6)	CFU	Comentarios extras
P19 CG SS	110	
P19 SG SS	26	
P22 CG SS	74	
P22 SG SS	143	
P22 SG CS	Incontable	
M19 CG SS	149	
M19 SG SS	108	
M22 CG SS	3	
M22 SG SS	224	
M22 SG CS	156	
S19 CG SS	23	23 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí
S19 SG SS	297	
S22 CG SS	16	16 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí

S22 SG SS	298	
S22 SG CS	31	31 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí

1.8.2. CONTEO Y VIABILIDAD CELULAR – MATRICES LÍQUIDAS

Semana 3

Tabla 14. Conteo en matrices líquidas semana 3, SIN dilución.

Producto (NPK%)	CFU	Comentarios extras
Pseudomonas aeruginosa 0-0-0	Incontable	
Pseudomonas aeruginosa 6-4-4	Incontable	
Pseudomonas aeruginosa 10-10-10	0	
Pseudomonas aeruginosa 0-30-0	20	
Pseudomonas aeruginosa 7-0-0	Incontable	
Pseudomonas aeruginosa 20-20-20	1	
Pseudomonas aeruginosa 0-20-20	3	
Pseudomonas aeruginosa 20-0-20	Incontable	
Pseudomonas aeruginosa 17-17-17	Incontable	
Bacillus megaterium 0-0-0	Incontable	
Bacillus megaterium 6-4-4	Incontable	
Bacillus megaterium 10-10-10	Incontable	
Bacillus megaterium 0-30-0	Incontable	
Bacillus megaterium 7-0-0	79	
Bacillus megaterium 20-20-20	65	
Bacillus megaterium 0-20-20	45	
Bacillus megaterium 20-0-20	Incontable	
Bacillus megaterium 17-17-17	Incontable	
Bacillus subtilis 0-0-0	150	
Bacillus subtilis 6-4-4	0	

Bacillus subtilis 10-10-10	Incontable	43 individuales, sin embargo, la caja Petri se encuentra cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable
Bacillus subtilis 0-30-0	Incontable	42 individuales, sin embargo, la caja Petri se encuentra cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable
Bacillus subtilis 7-0-0	Incontable	89 individuales, sin embargo, la caja Petri se encuentra cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable
Bacillus subtilis 20-20-20	Incontable	49 individuales, sin embargo, la caja Petri se encuentra cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable
Bacillus subtilis 0-20-20	0	
Bacillus subtilis 20-0-20	Incontable	102 individuales, sin embargo, la caja Petri se encuentra cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable
Bacillus subtilis 17-17-17	Incontable	

Tabla 15. Conteo en matrices líquidas semana 3, dilución 10^3 .

Producto (NPK%) 10^3	CFU	Comentarios extras
Pseudomonas aeruginosa 0-0-0	Incontable	
Pseudomonas aeruginosa 6-4-4	Incontable	
Pseudomonas aeruginosa 10-10-10	0	
Pseudomonas aeruginosa 0-30-0	0	
Pseudomonas aeruginosa 7-0-0	Incontable	
Pseudomonas aeruginosa 20-20-20	0	

Pseudomonas aeruginosa 0-20-20	0	
Pseudomonas aeruginosa 20-0-20	Incontable	
Pseudomonas aeruginosa 17-17-17	Incontable	
Bacillus megaterium 0-0-0	Incontable	
Bacillus megaterium 6-4-4	134	
Bacillus megaterium 10-10-10	235	
Bacillus megaterium 0-30-0	57	
Bacillus megaterium 7-0-0	63	
Bacillus megaterium 20-20-20	172	
Bacillus megaterium 0-20-20	45	
Bacillus megaterium 20-0-20	Incontable	
Bacillus megaterium 17-17-17	124	
Bacillus subtilis 0-0-0	106	
Bacillus subtilis 6-4-4	0	
Bacillus subtilis 10-10-10	56	
Bacillus subtilis 0-30-0	14	
Bacillus subtilis 7-0-0	24	
Bacillus subtilis 20-20-20	42	
Bacillus subtilis 0-20-20	0	
Bacillus subtilis 20-0-20	Incontable	
Bacillus subtilis 17-17-17	97	

Tabla 16. Conteo en matrices líquidas semana 3, dilución 10^6 .

Producto (NPK%) 10^6	CFU	Comentarios extras
Pseudomonas aeruginosa 0-0-0	Incontable	
Pseudomonas aeruginosa 6-4-4	Incontable	
Pseudomonas aeruginosa 10-10-10	0	
Pseudomonas aeruginosa 0-30-0	0	
Pseudomonas aeruginosa 7-0-0	Incontable	
Pseudomonas aeruginosa 20-20-20	0	
Pseudomonas aeruginosa 0-20-20	0	
Pseudomonas aeruginosa 20-0-20	Incontable	

Pseudomonas aeruginosa 17-17-17	Incontable	
Bacillus megaterium 0-0-0	112	
Bacillus megaterium 6-4-4	24	
Bacillus megaterium 10-10-10	171	
Bacillus megaterium 0-30-0	48	
Bacillus megaterium 7-0-0	157	
Bacillus megaterium 20-20-20	160	
Bacillus megaterium 0-20-20	36	
Bacillus megaterium 20-0-20	Incontable	
Bacillus megaterium 17-17-17	132	
Bacillus subtilis 0-0-0	33	
Bacillus subtilis 6-4-4	0	
Bacillus subtilis 10-10-10	43	
Bacillus subtilis 0-30-0	10	
Bacillus subtilis 7-0-0	3	
Bacillus subtilis 20-20-20	34	
Bacillus subtilis 0-20-20	0	
Bacillus subtilis 20-0-20	51	
Bacillus subtilis 17-17-17	66	

Semana 6

Tabla 17. Conteo en matrices líquidas semana 6, SIN dilución.

Producto (NPK%)	CFU	Comentarios extras
Pseudomonas aeruginosa 0-0-0	Incontable	
Pseudomonas aeruginosa 6-4-4	Incontable	
Pseudomonas aeruginosa 10-10-10	Incontable	
Pseudomonas aeruginosa 0-30-0	5	
Pseudomonas aeruginosa 7-0-0	Incontable	
Pseudomonas aeruginosa 20-20-20	0	
Pseudomonas aeruginosa 0-20-20	8	
Pseudomonas aeruginosa 20-0-20	60	
Pseudomonas aeruginosa 17-17-17	136	
Bacillus megaterium 0-0-0	Incontable	
Bacillus megaterium 6-4-4	Incontable	
Bacillus megaterium 10-10-10	Incontable	
Bacillus megaterium 0-30-0	Incontable	
Bacillus megaterium 7-0-0	Incontable	
Bacillus megaterium 20-20-20	Incontable	
Bacillus megaterium 0-20-20	Incontable	
Bacillus megaterium 20-0-20	Incontable	
Bacillus megaterium 17-17-17	Incontable	
Bacillus subtilis 0-0-0	Incontable	
Bacillus subtilis 6-4-4	Incontable	
Bacillus subtilis 10-10-10	Incontable	
Bacillus subtilis 0-30-0	Incontable	
Bacillus subtilis 7-0-0	Incontable	
Bacillus subtilis 20-20-20	Incontable	
Bacillus subtilis 0-20-20	Incontable	
Bacillus subtilis 20-0-20	Incontable	
Bacillus subtilis 17-17-17	Incontable	

Tabla 18. Conteo en matrices líquidas semana 6, dilución 10^3 .

Producto (NPK%) 10^3	CFU	Comentarios extras
Pseudomonas aeruginosa 0-0-0	Incontable	20 individuales, sin embargo, la caja Petri se encuentra cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable
Pseudomonas aeruginosa 6-4-4	Incontable	31 individuales, sin embargo, la caja Petri se encuentra cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable
Pseudomonas aeruginosa 10-10-10	Incontable	31 individuales, sin embargo, la caja Petri se encuentra cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable
Pseudomonas aeruginosa 0-30-0	54	54 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí
Pseudomonas aeruginosa 7-0-0	Incontable	31 individuales, sin embargo, la caja Petri se encuentra cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable
Pseudomonas aeruginosa 20-20-20	Incontable	81 individuales, sin embargo, la caja Petri se encuentra cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable
Pseudomonas aeruginosa 0-20-20	Incontable	27 individuales, sin embargo, la caja Petri se encuentra cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable
Pseudomonas aeruginosa 20-0-20	Incontable	45 individuales, sin embargo, la caja Petri se encuentra cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable
Pseudomonas aeruginosa 17-17-17	Incontable	81 individuales, sin embargo, la

		caja Petri se encuentra cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable
Bacillus megaterium 0-0-0	Incontable	
Bacillus megaterium 6-4-4	Incontable	
Bacillus megaterium 10-10-10	Incontable	
Bacillus megaterium 0-30-0	Incontable	
Bacillus megaterium 7-0-0	Incontable	
Bacillus megaterium 20-20-20	Incontable	
Bacillus megaterium 0-20-20	Incontable	
Bacillus megaterium 20-0-20	Incontable	
Bacillus megaterium 17-17-17	Incontable	
Bacillus subtilis 0-0-0	Incontable	
Bacillus subtilis 6-4-4	Incontable	45 individuales, sin embargo, la caja Petri se encuentra cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable
Bacillus subtilis 10-10-10	Incontable	
Bacillus subtilis 0-30-0	123	123 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí
Bacillus subtilis 7-0-0	Incontable	
Bacillus subtilis 20-20-20	Incontable	
Bacillus subtilis 0-20-20	Incontable	
Bacillus subtilis 20-0-20	Incontable	
Bacillus subtilis 17-17-17	Incontable	

Tabla 19. Conteo en matrices líquidas semana 6, dilución 10^6 .

Producto (NPK%) 10^6	CFU	Comentarios extras
Pseudomonas aeruginosa 0-0-0	61	61 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí

Pseudomonas aeruginosa 6-4-4	47	47 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí
Pseudomonas aeruginosa 10-10-10	46	46 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí
Pseudomonas aeruginosa 0-30-0	21	21 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí
Pseudomonas aeruginosa 7-0-0	78	78 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí
Pseudomonas aeruginosa 20-20-20	53	53 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí
Pseudomonas aeruginosa 0-20-20	19	19 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí
Pseudomonas aeruginosa 20-0-20	55	55 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí
Pseudomonas aeruginosa 17-17-17	73	73 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí
Bacillus megaterium 0-0-0	Incontable	
Bacillus megaterium 6-4-4	Incontable	
Bacillus megaterium 10-10-10	Incontable	
Bacillus megaterium 0-30-0	Incontable	
Bacillus megaterium 7-0-0	Incontable	
Bacillus megaterium 20-20-20	Incontable	
Bacillus megaterium 0-20-20	Incontable	
Bacillus megaterium 20-0-20	Incontable	
Bacillus megaterium 17-17-17	Incontable	
Bacillus subtilis 0-0-0	Incontable	

Bacillus subtilis 6-4-4	Incontable	20 individuales, sin embargo, la caja Petri se encuentra cubierta por completo, pudiendo denotarse como incontable
Bacillus subtilis 10-10-10	50	50 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí
Bacillus subtilis 0-30-0	108	
Bacillus subtilis 7-0-0	Incontable	
Bacillus subtilis 20-20-20	102	102 individuales, sin embargo, existen colonias formadas más grandes unidas entre sí
Bacillus subtilis 0-20-20	Incontable	
Bacillus subtilis 20-0-20	Incontable	
Bacillus subtilis 17-17-17	Incontable	

1.8.3. VIABILIDAD CELULAR REPORTADA EN UFC/ML- MATRICES SÓLIDAS

	Fecha encapsulado	Tratamiento aplicado	A 3 semanas			A 6 semanas		
			UFC /mL			UFC/mL		
			Control	10 ³	10 ⁶	Control	10 ³	10 ⁶
<i>B. subtilis</i>	19	SG/SS	8.6E+02	1.1E+06	1.0E+07	2.0E+03	2.4E+06	3.0E+09
	19	CG/SS	3.2E+02	6.0E+04	0.0E+00	9.3E+02	6.1E+05	2.3E+08
	22	SG/SS	1.1E+03	3.6E+05	4.0E+07	3.0E+03	3.8E+06	3.0E+09
	22	SG/CS	4.9E+02	2.8E+05	0.0E+00	8.7E+02	4.0E+05	3.1E+08
	22	CG/SS	5.4E+02	3.2E+05	0.0E+00	2.9E+02	7.0E+04	1.6E+08
<i>B. megaterium</i>	19	CG/SS	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	4.2E+03	1.8E+06	1.5E+09
	19	SG/SS	3.9E+02	5.7E+05	1.0E+07	1.3E+03	1.3E+06	1.1E+09
	22	SG/SS	1.5E+03	3.4E+05	7.0E+07	0.0E+00	0.0E+00	2.2E+09
	22	SG/CS	2.5E+02	1.4E+06	8.0E+08	0.0E+00	9.4E+05	1.6E+09
	22	CG/SS	7.8E+02	1.2E+05	0.0E+00	3.3E+02	3.0E+04	3.0E+07
<i>P. aeruginosa</i>	19	SS/SG	7.2E+02	3.9E+05	3.8E+08	9.9E+02	8.6E+05	1.1E+09
	19	CG/SS	2.1E+02	6.0E+04	3.0E+07	5.1E+02	3.1E+05	2.6E+08
	22	SG/CS	1.8E+03	1.0E+05	4.0E+07	2.4E+03	1.8E+06	1.5E+09
	22	SS/SG	6.9E+02	2.4E+05	2.4E+08	1.8E+03	1.6E+06	1.4E+09
	22	CG/SS	3.5E+02	6.0E+04	2.0E+07	4.7E+02	3.0E+05	7.4E+08

1.8.4. VIABILIDAD CELULAR REPORTADA EN UFC/ML – MATRICES LÍQUIDAS










	Núm.matriz	A 3 semanas			A 6 semanas		
		UFC/mL			UFC/mL		
		Control	10 ³	10 ⁶	Control	10 ³	10 ⁶
<i>B.subtilis</i>	0 (Control)	1.5E+03	1.1E+06	3.3E+08	2.7E+03	2.3E+06	9.8E+08
	1	5.8E+02	0.0E+00	4.9E+08	3.3E+02	4.2E+05	2.0E+08
	2	4.3E+02	5.6E+05	4.3E+08	1.4E+03	1.2E+06	5.0E+08
	3	4.2E+02	1.4E+05	1.0E+08	1.6E+03	1.2E+06	1.1E+09
	4	8.9E+02	2.4E+05	3.0E+07	1.3E+03	1.1E+06	9.7E+08
	5	4.9E+02	4.2E+05	3.4E+08	1.8E+03	1.4E+06	1.0E+09
	6	8.8E+02	0.0E+00	7.1E+08	7.7E+02	3.9E+05	5.3E+08
	7	1.0E+03	9.8E+05	5.1E+08	1.4E+03	1.3E+06	9.9E+08
	8	8.9E+02	9.7E+05	6.6E+08	1.0E+03	1.2E+06	7.4E+08
<i>B.megaterium</i>	0 (Control)	1.2E+03	7.0E+04	1.1E+09	1.8E+03	5.3E+05	1.7E+09
	1	1.9E+03	1.3E+06	2.4E+08	2.1E+03	1.6E+06	4.0E+08
	2	3.0E+03	2.4E+06	1.7E+09	3.1E+03	3.1E+06	2.3E+09
	3	8.8E+02	5.7E+05	4.8E+08	1.3E+03	9.8E+05	7.7E+08
	4	7.9E+02	6.3E+05	1.6E+09	1.2E+03	9.1E+05	2.4E+09
	5	6.5E+02	1.7E+06	1.6E+09	1.7E+03	3.0E+06	2.1E+09
	6	4.5E+02	4.5E+05	3.6E+08	1.4E+03	1.3E+06	9.7E+08
	7	1.1E+03	4.9E+05	5.6E+08	1.3E+03	7.0E+05	6.6E+08
	8	1.9E+03	1.2E+06	1.3E+09	2.3E+03	1.8E+06	1.5E+09
<i>P.aeruginosa</i>	0 (Control)	4.4E+02	1.4E+05	6.0E+07	6.8E+02	2.0E+05	6.1E+08
	1	1.7E+03	9.6E+05	7.1E+08	1.8E+03	3.1E+05	4.7E+08
	2	0.0E+00	0.0E+00	3.3E+08	0.0E+00	3.1E+05	4.6E+08
	3	2.0E+02	0.0E+00	2.9E+08	5.0E+01	5.4E+05	2.1E+08
	4	2.7E+02	1.6E+05	1.6E+08	5.2E+02	3.1E+05	7.8E+08
	5	1.0E+01	0.0E+00	1.4E+08	0.0E+00	8.1E+05	5.3E+08
	6	3.0E+01	0.0E+00	1.0E+08	8.0E+01	2.7E+05	1.9E+08
	7	2.4E+03	9.9E+05	8.5E+08	6.0E+02	4.5E+05	5.5E+08
	8	1.3E+03	4.0E+05	1.0E+07	1.4E+03	8.1E+05	7.3E+08

1.8.5. COMPARACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR CON RESPECTO AL CONTEO INICIAL

Inicialmente, se planeaba comparar los resultados obtenidos a partir de los tratamientos contra conteos iniciales, es decir, sin ninguna modificación en el medio inoculado. No obstante, el crecimiento mostrado

fue nulo o incontable, no pudiendo rescatar este dato como el 100%, lo cual puede apreciarse en la siguiente Tabla 22.

Tabla 20. Viabilidad celular de las cepas.

Cepa	Control	10 ³	10 ⁶
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
<i>Bacillus megaterium</i>			
<i>Bacillus subtilis</i>			

Inclusive reportado lo anterior, se realizó a su vez un diseño de experimentos, relacionando este conteo inicial con los productos propuestos, por medio de *MiniTab*, específicamente doce pruebas Tukey, con el fin de conocer el mejor tratamiento para cada cepa de manera estadística además de observar si, entre ellas, existe una diferencia lo suficientemente representativa. Primero, se analizaron todas las matrices sólidas (microencapsulados) para poder determinar el mejor tratamiento para cada una de ellas, recordando que las variables en este análisis fueron la presencia o no tanto de glucosa como del suero. Se consideró también el tiempo de almacenado para ver que tanto afecta en la viabilidad del producto. Es importante mencionar que se trabajó con un nivel de confianza del 95% y un consecuente nivel de

confianza con $\alpha = 0.05$, y bajo las siguientes hipótesis:

H₀: El tratamiento aplicado **no** influencia en la viabilidad celular de la cepa durante un periodo de tiempo determinado

H_a: El tratamiento aplicado influencia en la viabilidad celular de la cepa durante un periodo de tiempo determinado

En el caso de *Bacillus subtilis* la aplicación de la prueba de Tukey no arrojó que la viabilidad de las cepas bajo los distintos tratamientos fuese lo suficientemente diferente o que presentaran una diferencia lo bastante significativa para determinar al mejor de los tres, esto también lo indica el valor del valor-p obtenido ($p = .324$) y por consecuente no se puede aceptar la hipótesis alternativa. En la Figura 17, se observa el análisis arrojado por el software.

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tratamiento	2	2.60215E+14	1.30107E+14	1.24	0.324
Error	12	1.26023E+15	1.05020E+14		
Total	14	1.52045E+15			

Figura 17. Análisis ANOVA para *B. subtilis* (3 semanas)

Al observar el agrupamiento de cada tratamiento utilizando el método de Tukey (Figura 17) se aprecia como todos comparten la misma letra, la “A”, esto indica lo anteriormente mencionado, es justo en este análisis donde se observaría si alguno de los tratamientos fuera distinto porque saldría otra letra, en este caso la “B”.

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Tratamiento	N	Mean	Grouping
SG/SS	6	8575325	A
SG/CS	3	93497	A
CG/SS	6	63477	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Figura 18. Agrupamiento con método de Tukey para *B.subtilis* (3 semanas)

Los gráficos estadísticos también son de gran ayuda a visualizar la tendencia de los datos obtenidos, en este caso el gráfico de los intervalos de confianza de Tukey al 95%, ilustrado en la Figura 18, muestra la comparación entre los tratamientos del estudio y corrobora lo que ya se

había visto anteriormente, que no existe una diferencia significativa entre las respuestas con respecto a los tratamientos obtenidos esto porque para los tres casos contienen al cero dentro de los intervalos.

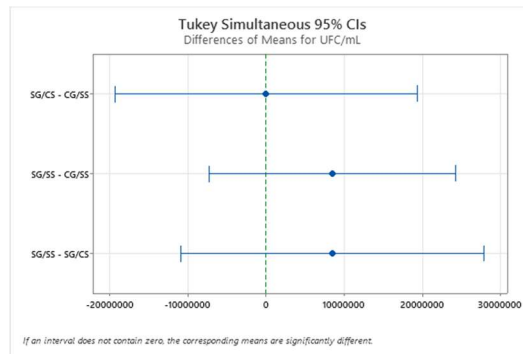


Figura 19. Intervalos de confianza simultáneos para *B. subtilis* (3 semanas)

Por otro lado, el gráfico de los intervalos de confianza entre cada una de las medias analizadas (Figura 19) sigue confirmando lo que ya se había determinado con anterioridad, además de que se observa que los tratamientos donde sí se añadió ya sea suero o glucosa, presentan la misma tendencia, solo que como se tiene un menor número de muestra para el caso de SG/CS el tamaño o la altura del intervalo aumenta.

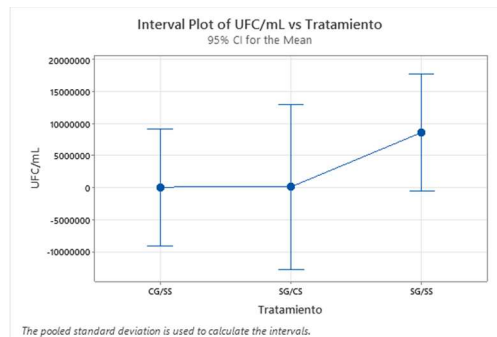


Figura 20. Intervalos de confianza de las medias obtenidas para *B. subtilis* (3 semanas)

A continuación, se observan los gráficos de residuales otorgados por el programa (Figura 20) donde es claro ver, sobre todo en los dos superiores, como los datos no se ajustan o no muestran una tendencia “normal” que se esperaría al generar estas tablas. Por ejemplo, al ver el gráfico de probabilidad normal (superior izquierda) es súper notorio que los datos no se ajustan al modelo de regresión generado además de que el comportamiento no corresponde a un modelo lineal. El histograma (inferior izquierdo) indica que el modelo presenta valores atípicos.

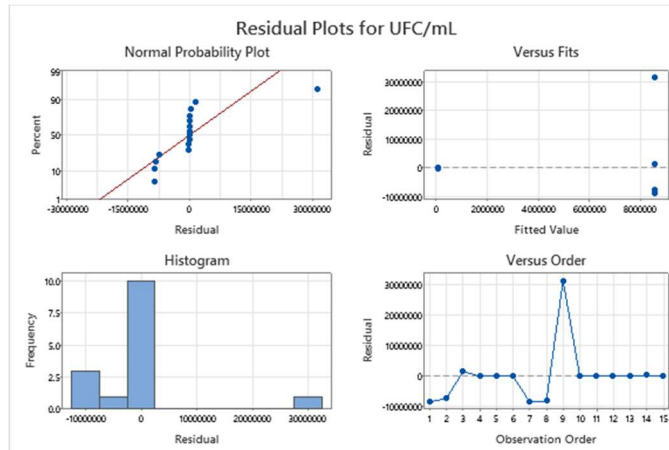


Figura 21. Diferentes gráficos residuales obtenidos para *B. subtilis* (3 semanas)

Analizando la misma cepa, pero transcurridas tres semanas más desde el almacenamiento se observó que el comportamiento mostrado anteriormente continuó sin importar el aumento del periodo de almacenaje, y aunque se tiene un *p-value* (0.258) menor al caso anterior, este no es suficiente para desestimar la hipótesis nula (Figura 21). Aumentó la viabilidad de las repeticiones lo que a su vez aumenta la media del tratamiento, esto último se nota para los tres tratamientos (Figura 22).

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tratamiento	2	3.01570E+18	1.50785E+18	1.52	0.258
Error	12	1.19056E+19	9.92130E+17		
Total	14	1.49213E+19			

Figura 22. Análisis de varianza para *B. subtilis* (6 semanas)

Al igual que como sucedió con el periodo de almacenado de tres semanas, las muestras evaluadas a las seis semanas no mostraron una diferencia significativa de sus viabilidades (Figura 22), siendo el tratamiento “control” el que mayor viabilidad presenta una vez concluidas las seis semanas desde el almacenaje inicial.

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Tratamiento	N	Mean	Grouping
SG/SS	6	992707493	A
SG/CS	3	103466957	A
CG/SS	6	65113537	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Figura 23. Agrupamiento con método de Tukey para *B. subtilis* (6 semanas)

Observando las siguientes figuras (Figura 23 y 24) y comparándolas con sus predecesoras realmente no existe mucha diferencia entre los comportamientos mostrados, ya que las correspondientes a este nuevo

análisis son casi iguales a aquellas de tres semanas de almacenado.

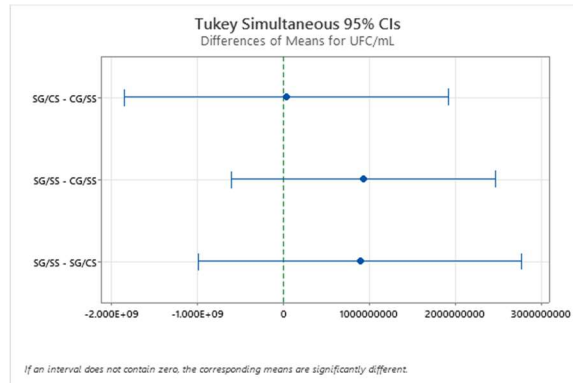


Figura 24. Intervalos de confianza simultáneos al 95% para *B. subtilis* (6 semanas)

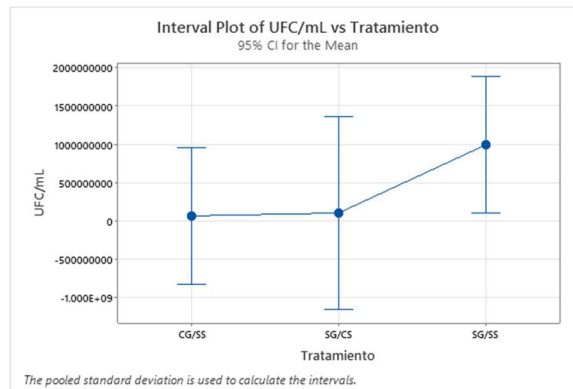


Figura 25. Intervalos de confianza para las medias obtenidas para *B. subtilis* (6 semanas)

Al observar los gráficos de residuales (Figura 25) si es posible notar que hay una diferencia con respecto a los de la semana tres, por ejemplo, en el gráfico de probabilidad normal (superior izquierda) prevalece ese valor alejado o atípico, pero ahora hay más separación entre las dos columnas restantes, lo que indica una asimetría de datos.

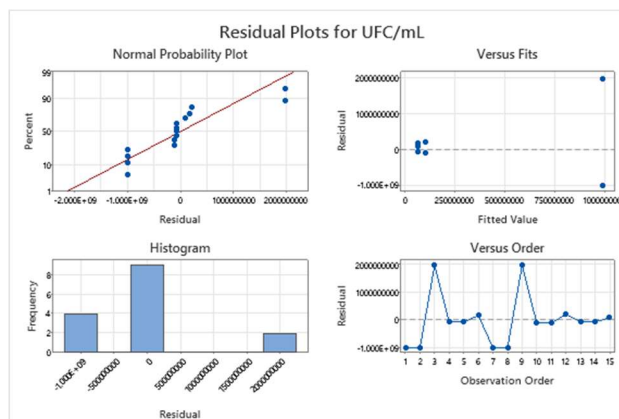


Figura 26. Diferentes gráficos residuales obtenidos para *B. subtilis* (6 semanas)

La segunda cepa analizada correspondió a *Bacillus megaterium*, bajo las mismas suposiciones asumidas para su predecesora con respecto al planteamiento de las hipótesis y las condiciones bajo las cuales se realizó el diseño del experimento. Al igual que con *B. subtilis*, debido al *p-value* obtenido (0.145), ilustrado en la Figura 26: la hipótesis alternativa no puede ser aceptada y se asume que no existe evidencia estadística que permita determinar si las medias poblacionales presentan alguna diferencia significativa entre ellas.

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tratamiento	2	1.63272E+17	8.16359E+16	2.28	0.145
Error	12	4.29815E+17	3.58179E+16		
Total	14	5.93086E+17			

Figura 27. Análisis de varianza para *B. megaterium* (3 semanas)

La Figura 27 ilustra los hallazgos obtenidos mediante la aplicación del método de Tukey, que permite visualizar el comportamiento de las medias poblacionales de los datos. En este caso, al estar agrupadas bajo una sola letra, la letra “A”, indica que no existe diferencia significativa entre ellas, que es lo que se suponía con el análisis de varianzas realizado previamente. Algo importante de notar es que dicha tabla es ordenada de mayor a menos, siendo la media con mayor valor la correspondiente al tratamiento SG/SS, pero esto puede también deberse a que se trabajó una población menor a los otros tratamientos.

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Tratamiento	N	Mean	Grouping
SG/CS	3	267143417	A
SG/SS	6	13485313	A
CG/SS	6	20130	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Figura 28. Agrupamiento bajo el método de Tukey para *B. megaterium* (3 semanas)

Como se puede apreciar en la Figura 28, todos los intervalos de confianza simultáneos al 95% contienen al cero dentro del rango donde se deposita la media de los datos, reafirmando que el tratamiento aplicado no marcó un efecto tan pronunciado en la viabilidad celular de los microencapsulados realizados.

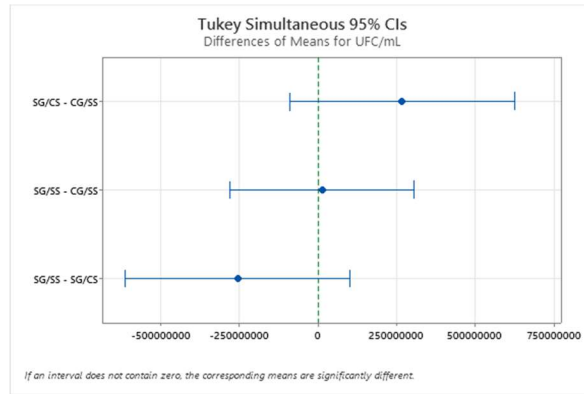


Figura 29. Intervalos de confianza simultáneos al 95% para *B. megaterium* /3 semanas)

Ahora bien, observando el gráfico de los intervalos de confianza (Figura 29) se puede identificar que el tratamiento correspondiente a SG/CS (Sin Glucosa/Sin Suero) es, aparentemente, el que mayor diferencia entre los tres, seguido del tratamiento SG/SS, que a su vez tiene su centro un poco desplazado hacia arriba del tratamiento CG/SS.

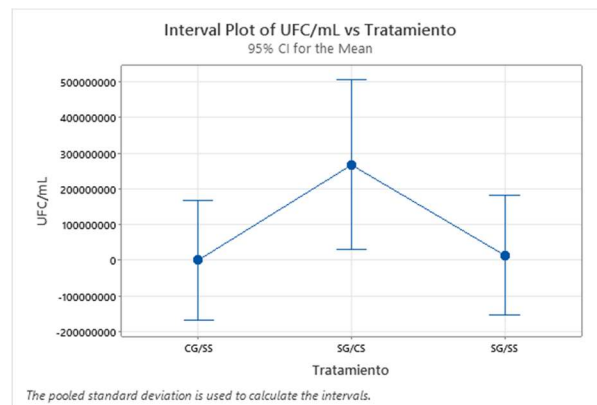


Figura 30. Intervalos de confianza obtenidos para *B. megaterium* (3 semanas)

Para los gráficos de residuales (Figura 30), se observa en el gráfico de probabilidad normal (superior izquierda) que nuevamente no se sigue el modelo, ya que los datos (la gran mayoría) se agrupan además de que no siguen una distribución a lo largo de la línea recta; el histograma (inferior izquierda) tampoco muestra un comportamiento ideal, es decir, no se ve la simetría que normalmente se observa cuando los datos no están sesgados, etc.

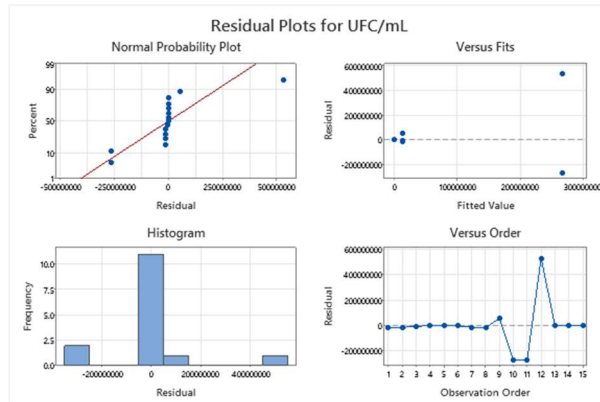


Figura 31. Diferentes gráficos residuales obtenidos para *B. megaterium* (3 semanas)

Aplicando los mismos criterios, pero ahora para *Bacillus megaterium* preservada seis semanas se obtienen resultados parecidos a aquellos con un menor tiempo de almacenado, ya que al observar el *p*-value obtenido (0.796) no es posible rechazar la hipótesis nula así que automáticamente se asume que los tratamientos no influyeron en la respuesta de los microencapsulados al pasar un periodo de tiempo bajo refrigeración. El análisis de las varianzas se observa en la Figura 31.

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tratamiento	2	3.02520E+17	1.51260E+17	0.23	0.796
Error	12	7.80197E+18	6.50165E+17		
Total	14	8.10449E+18			

Figura 32. Análisis de varianza para *B. megaterium* (6 semanas)

Mediante el agrupamiento utilizando el método de Tukey (Figura 32) es notorio que de manera estadística las medias no presentan una diferencia significativa entre ellas por lo que están agrupadas bajo una misma y única letra, en este caso la A, pero de igual forma se puede observar que de acuerdo al orden bajo el cual están acomodadas el tratamiento etiquetado como SG/CS pareciera ser mejor que el CG/SS.

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Tratamiento	N	Mean	Grouping
SG/SS	6	553541883	A
SG/CS	3	520313333	A
CG/SS	6	253640755	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Figura 33. Agrupamiento utilizando el método de Tukey para *B. megaterium* (6 semanas)

Tanto la Figura 33 como la Figura 34 ilustran los diferentes intervalos de confianza obtenidos para las medias de las tres muestras distintas y dentro de ellas es posible ver también como, por ejemplo, en el

caso de los simultáneos, como las tres comparaciones engloban el valor de cero, lo cual las hace ser estadísticamente iguales; Por otro lado en el de intervalos de confianza de las medias, se observa como el tratamiento control se encuentra por arriba de sus dos contrapartes pero no existe un desfase que lo apropie a ser estadísticamente diferente.

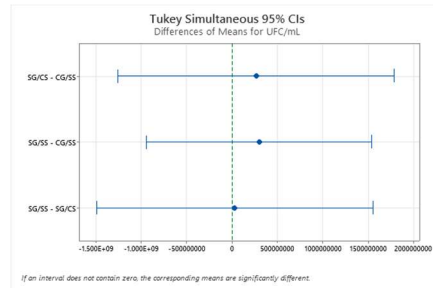


Figura 34. Intervalos de confianza simultáneos al 95% para *B. megaterium* (6 semanas)

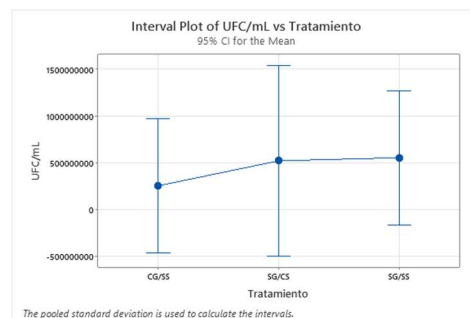


Figura 35. Intervalos de confianza obtenidos para *B. megaterium* (6 semanas)

Observando el gráfico de probabilidad normal (superior izquierda) que se encuentra dentro de la Figura 35, es notorio que a pesar de que sigue habiendo puntos que no se ajustan al modelo supuesto, ya hay algunos que siguen la tendencia, lo cual no había sucedido en el análisis de las tres semanas. Se ve también una diferencia entre el gráfico de residuos vs ajustes (superior derecha), ya que en el análisis previo los puntos estaban sobrepuestos pero cercanos al cero (en algunos casos), mientras que en este hay varios puntos que pueden considerarse atípicos lo cual invalida al modelo propuesto y además muestra que las varianzas de los residuos no son constantes.

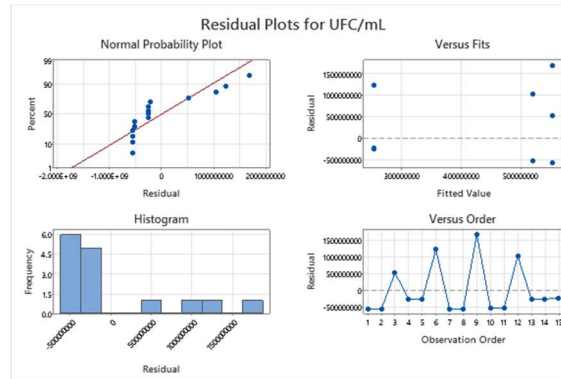


Figura 36. Diferentes gráficos residuales obtenidos para *B. megaterium* (6 semanas)

Por último, se encuentra el análisis de la viabilidad celular del microencapsulado utilizando como agente biocontrolador a *Pseudomonas aeruginosa*, donde como primer parámetro para determinar la influencia de los tratamientos en la respuesta, en este caso, sobre la viabilidad celular. Como se observa en la Figura 37 36, se tiene un *p-value* de 0.296, por lo tanto, no es posible rechazar la hipótesis nula y se concluye que el tratamiento no influencia en la viabilidad celular de las muestras analizadas.

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tratamiento	2	3.14644E+16	1.57322E+16	1.35	0.296
Error	12	1.39748E+17	1.16457E+16		
Total	14	1.71213E+17			

Figura 37. Análisis de varianza para *P. aeruginosa* (3 semanas)

Observando el agrupamiento generado mediante el método de Tukey (Figura 37) se puede concluir que no existe alguna diferencia lo suficientemente significativa entre los tratamientos que pueda respaldar a la hipótesis alternativa propuesta, esto porque los tres tratamientos, a pesar de que observando las medias obtenidas y notar que sus medias si son diferentes, la variación entre los datos no arroja que estas sean distintas y se encasillas bajo un mismo y único agrupamiento.

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Tratamiento	N	Mean	Grouping
SG/SS	6	103438568	A
SG/CS	3	13367267	A
CG/SS	6	8353427	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Figura 38. Agrupamiento utilizando el método de Tukey para *P. aeruginosa* (3 semanas)

Como ocurre al analizar los demás tratamientos y aunque se trate de microorganismos diferentes, las tendencias con respecto a los intervalos de confianza simultáneos (Figura 38) al igual que con los que no

comparan entre ellos mismos (Figura 39) permanecen, por ejemplo, en la Figura 39 viendo el centro de los intervalos se alcanza a percibir un ligero desfase del tratamiento SG/CS con respecto a CG/SS que puede indicar una mejor respuesta a dicho tratamiento, pero es pertinente mencionar que es probable que se deba al número de muestra utilizado (3 vs 6).

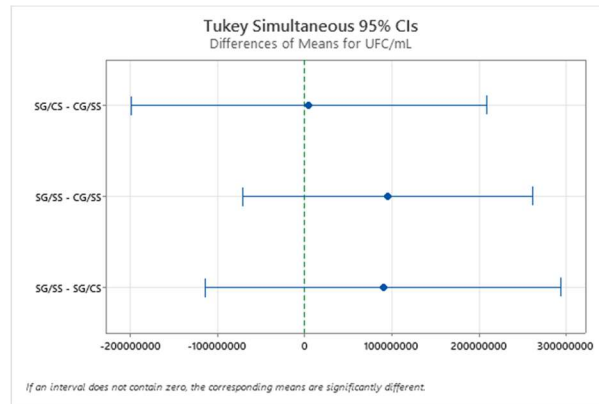


Figura 39. Intervalos de confianza simultáneos al 95% para *P. aeruginosa* (3 semanas)

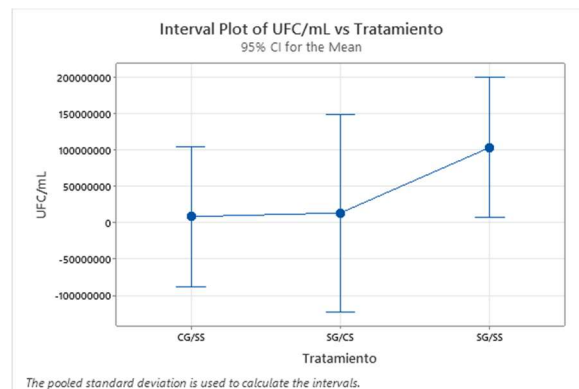


Figura 40. Intervalos de confianza para *P. aeruginosa* (3 semanas)

Todos los gráficos mostrados en la Figura 40 son indicadores de que la tendencia de los residuos supuestos no es clara, por ejemplo, al prestar atención al gráfico de probabilidad normal se ve que los residuos no siguen un comportamiento lineal, además de que existen valores muy atípicos que se alejan bastante del comportamiento teórico calculado, indicando también que el error no está distribuido de manera normal.

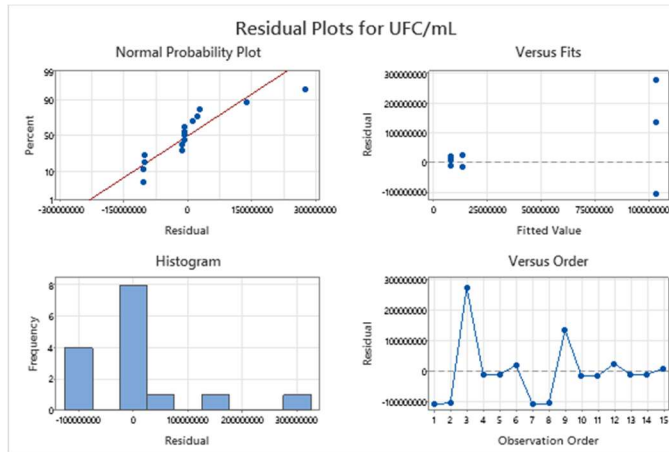


Figura 41. Diferentes gráficos residuales obtenidos para *P. aeruginosa* (3 semanas)

Realizando el análisis de varianza teniendo un periodo de almacenado de seis semanas (Figura 41) se obtuvo un *p-value* mayor al obtenido a las tres semanas (0.657), así que la hipótesis nula establecida desde el inicio del análisis sigue aceptándose.

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tratamiento	2	3.00850E+17	1.50425E+17	0.43	0.657
Error	12	4.15284E+18	3.46070E+17		
Total	14	4.45369E+18			

Figura 42. Análisis de varianza para *P. aeruginosa* (6 semanas)

Al realizar el análisis bajo el método de Tukey, se obtuvo que no existe diferencia significativa que sea capaz de identificar a un mejor tratamiento entre los tres analizados por lo que se agrupan bajo una misma letra, como se indica en la Figura 42. Observando las medias de cada tratamiento se nota que van en orden descendente de arriba hacia abajo, siendo el tratamiento con menor respuesta el catalogado como CG/SS, quedando el “control” en medio de los tratamientos.

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Tratamiento	N	Mean	Grouping
SG/CS	3	503947367	A
SG/SS	6	422020132	A
CG/SS	6	166768497	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Figura 43. Agrupamiento utilizando el método de Tukey para *P. aeruginosa* (6 semanas)

Con respecto a los gráficos de intervalos puede verse que los rangos de datos para ambas ilustraciones, tanto la de intervalos simultáneos como la de intervalos de confianza individuales contienen el cero dentro

de ellos así que no pueden ser considerados diferentes entre sí.

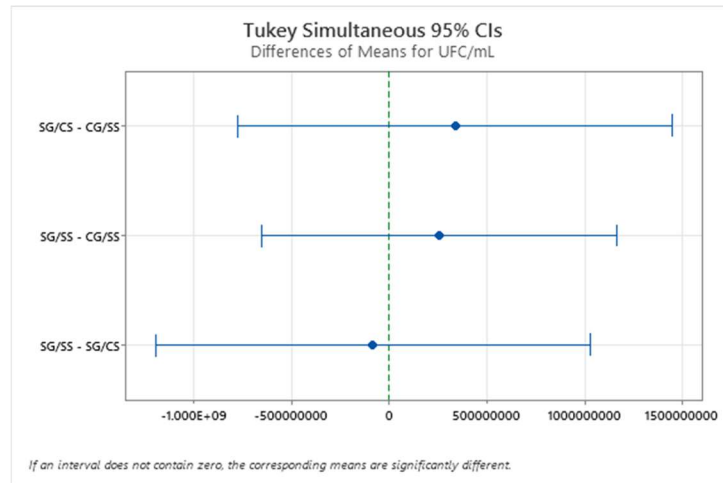


Figura 44. Intervalos de confianza simultáneos al 95% para *P. aeruginosa* (6 semanas)

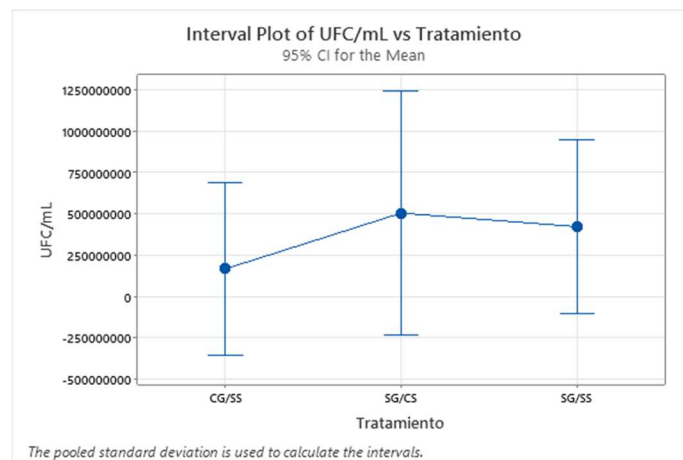


Figura 45. Intervalos de confianza para *P. aeruginosa* (6 semanas)

Con respecto a los gráficos de residuales (Figura 45) se puede ver que los datos para esta cepa no tienen una tendencia muy clara, por ejemplo, al observar el histograma (inferior izquierdo) no se ve una tendencia clara de la campana Gaussiana que se observa generalmente, esto puede deberse igual a que no existen los suficientes puntos de datos para garantizar una buena fiabilidad.

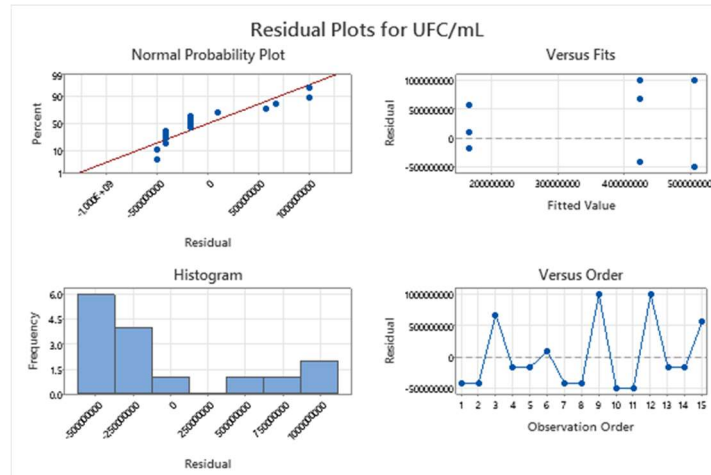


Figura 46. Diferentes gráficos residuales obtenidos para *P. aeruginosa* (6 semanas)

Considerando los resultados obtenidos para todas las cepas y sus correspondientes periodos de almacenado, se puede decir concluir que para el periodo de observación no se encontró evidencia estadística lo suficientemente contundente para determinar que la respuesta a los tratamientos, en este caso la viabilidad celular, presenta influencia debido a su aplicación lo que le permitiría a su vez, una vida de anaquel más prolongada. Lo que sí se pudo notar fue que las cepas presentan una buena viabilidad al haber pasado mes y medio desde la encapsulación del agente biocontrolador.

De la misma manera, se realizaron los análisis pertinentes sobre la viabilidad celular de las matrices líquidas bajo una serie de diferentes formulaciones distintas y encontrar, para cada microorganismo, la que mejor vida de anaquel presenta con relación a la cantidad de nutriente suministrado. Al igual que con las matrices sólidas, se utilizó un nivel de confianza del 95% y una $\alpha = 0.05$ para el nivel de significancia. Las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

H₀: La media para todos los tratamientos es igual sin importar la formulación

H_a: La media para todos los tratamientos es diferente de acuerdo con su formulación

Como primer parámetro se encuentra el análisis de la varianza, el cual arrojó un *p-value* de 0.973 que automáticamente hace que no se pueda rechazar la hipótesis nula debido a que es un valor mucho más alto que 0.05 que corresponde al valor de *alpha*. En la Figura 46 se aprecia la tabla generada que corresponde al análisis mencionado.

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Matriz	8	1.40163E+17	1.75204E+16	0.25	0.973
Error	18	1.23886E+18	6.88257E+16		
Total	26	1.37903E+18			

Figura 47. Análisis de varianza para *B. subtilis* (3 semanas)

Otra de las opciones bajo las cuales se puede observar por qué se aceptó la hipótesis nula es viendo el agrupamiento generado al utilizar el método de Tukey (Figura 47) donde, en efecto, todas las medias se agrupan como un solo grupo, lo cual quiere decir que, entre ellas, no existe una diferencia significativa que pueda diferenciarlas. A pesar de esto, es posible notar que para esta cepa en específico y para el periodo de tiempo transcurrido, la matriz 6 es la que presenta un promedio de viabilidad celular mayor a sus contrapartes, seguida de la matriz 8 y la matriz 7.

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Matriz N	Mean	Grouping
6	236666960	A
8	220323630	A
7	170327000	A
1	163333527	A
2	143520143	A
5	113473497	A
0	110367167	A
3	33380140	A
4	10080297	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Figura 48. Agrupamiento utilizando el método de Tukey para *B. subtilis* (3 semanas)

El gráfico de intervalos de confianza simultáneos al 95% del nivel de confianza (Figura 48) brinda una comparación entre las diferentes medias de cada uno de los grupos, y como se puede notar todos los enfrentamientos entre los diferentes grupos incluyen al cero dentro del rango del intervalo de confianza, lo que quiere decir que no hay diferencia significativa entre esos grupos.

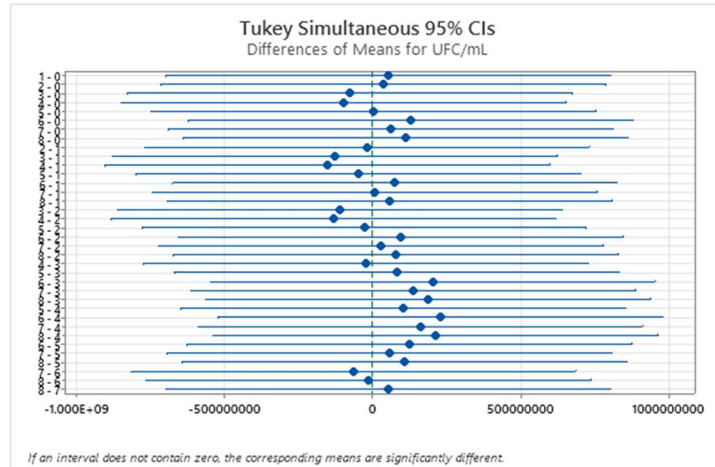


Figura 49. Intervalos de confianza simultáneos al 95% para *B. subtilis* (3 semanas)

La Figura 49 presenta los intervalos de confianza al 95% para cada una de las matrices, donde el punto en cada una de las líneas presenta a la media de dicha matriz. Es notorio que todas engloban al cero y si se perciben desfases del punto medio de la gráfica que en este caso es el cero; como se había mencionado anteriormente, el mejor del resto en cuestión de las matrices es la número 6.

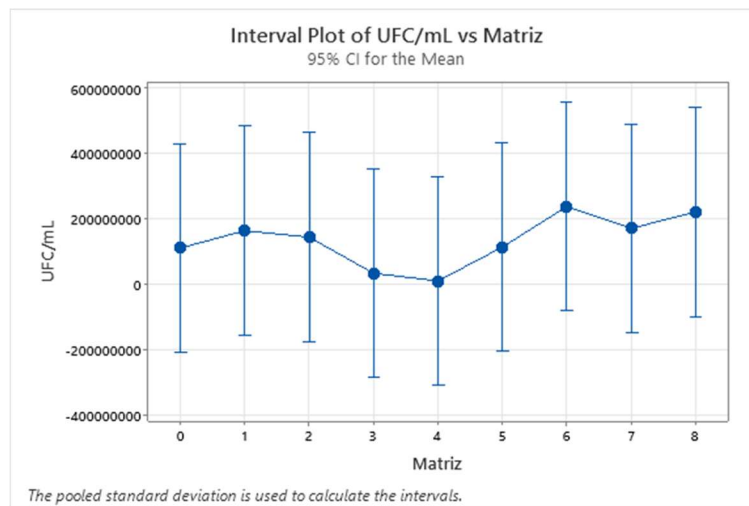


Figura 50. Intervalos de confianza de las diferentes matrices para *B. subtilis* (3 semanas)

Analizando de igual manera los gráficos residuales se tiene que los residuos no cumplen con una distribución normal (Figura 50 – superior izquierda), esto debido a la forma que toma la serie de datos residuales, que se ve sigue una tendencia decreciente, según lo consultado en el portal del software esto implicaría que existe una distribución asimétrica hacia el lado derecho. Ahora, el gráfico de residuos vs los valores ajustados (Figura 50 – superior derecha) presenta una tendencia entre ambos sets de datos, señal de que presentan una varianza no constante.

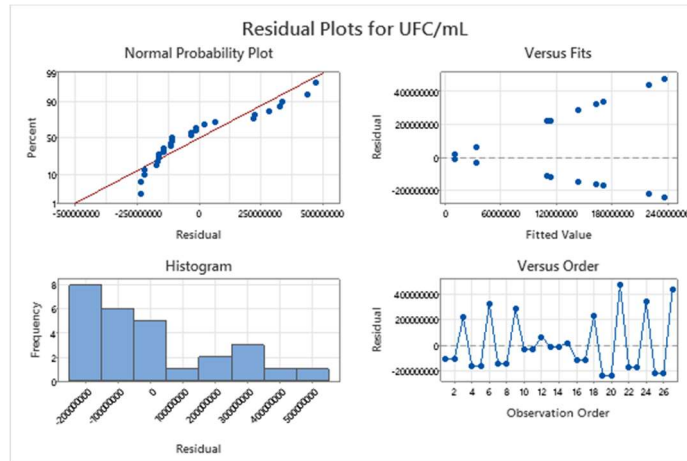


Figura 51. Diferentes gráficos residuales obtenidos para *B. subtilis* (3 semanas)

Continuando con el análisis de *Bacillus subtilis*, pero ahora con un periodo de almacenado de seis semanas se generó el análisis de la varianza (Figura 52) obteniéndose un *p-value* de 0.629 que, como ocurrió en la observación anterior, se acepta la hipótesis nula y se considera el supuesto de que los tratamientos arrojan medias iguales sin importar la formulación a la cual fue sometida.

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Matriz	8	2.12465E+18	2.65581E+17	0.78	0.629
Error	18	6.15936E+18	3.42187E+17		
Total	26	8.28401E+18			

Figura 52. Análisis de varianza para *B. subtilis* (6 semanas)

Al hacer la comparación de las medias de todos los tratamientos utilizando Tukey, el programa agrupó a todas ellas en uno solo dando así a entender que efectivamente, no hay diferencia significativa entre todos los grupos y se respalda lo generado por el ANOVA. También se puede ver que cambia el orden de las medias, como se puede ver en la Figura 52, donde pasan a los primeros lugares (obviando al control) las matrices 3 y 5, cuando anteriormente habían sido las matrices 6 y 8 las que mostraban una buena conservación de viabilidad.

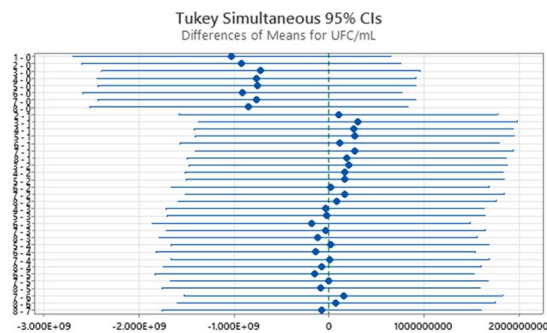
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Matriz N	Mean	Grouping
0	3 1093334233	A
3	3 367067200	A
5	3 333800600	A
7	3 330433800	A
4	3 323700433	A
8	3 247067000	A
6	3 176796923	A
2	3 167067133	A
1	3 66806777	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Figura 53. Agrupamiento utilizando el método de Tukey para *B. subtilis* (6 semanas)

A continuación, se presentan los gráficos para los intervalos de confianza simultáneos (Figura 53) y los intervalos de confianza de los tratamientos individuales (Figura 54). Observando el primero de ellos, es notorio que las comparaciones entre matrices y los intervalos generados para cada una encasillan al cero, por lo que se sustenta lo establecido anteriormente acerca de la inexistencia de un mejor tratamiento entre todos.



If an interval does not contain zero, the corresponding means are significantly different.

Figura 54. Intervalos de confianza simultáneos al 95% para *B. subtilis* (6 semanas)

La Figura 54 presenta los intervalos de confianza generados para cada tratamiento de forma individual sin comparar las medias entre ellos, y es notorio como el tratamiento cero o “control” presente, para este escenario, un intervalo de confianza donde la media no engloba el cero dentro del rango de la posible viabilidad celular obtenida y pudiera ser considerada como estadísticamente diferente si no se superpusiera a las demás formulaciones.

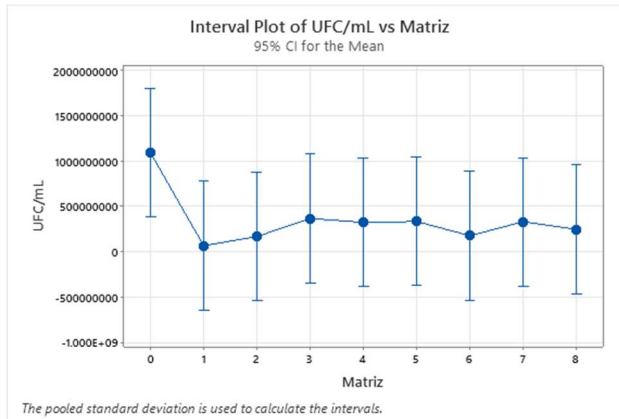


Figura 55. Intervalos de confianza para las medias de *B. subtilis* (6 semanas)

Por último, los diferentes gráficos residuales obtenidos (Figura 55) dan información acerca del comportamiento en diferentes cuestiones o en diferentes análisis residuales. Tanto el histograma como el gráfico de los residuos vs los valores ajustados presentan dentro de los datos algunos valores atípicos que invalidan el valor del gráfico correspondiente. Analizando el gráfico de la probabilidad normal, se alcanza a ver que también hay valores atípicos en los extremos, mientras que los otros valores no siguen un comportamiento lineal como lo llega a ser el de la línea roja.

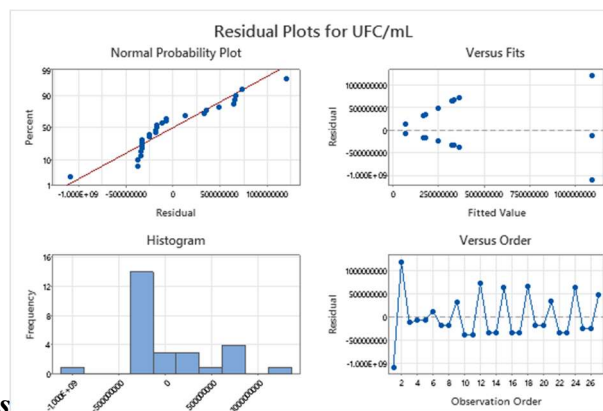


Figura 56. Diferentes gráficos residuales obtenidos para *B. subtilis* (6 semanas)

Se realizó también el mismo análisis anterior para *B. megaterium* donde como primera instancia se llevó a cabo el análisis de la varianza de los datos (Figura 56), obteniendo un *p-value* de 0.969, lo que hace que la hipótesis nula no pueda rechazarse y se trabaja bajo el supuesto de que no existe diferencia entre las medias de viabilidad celular obtenidas en cada tratamiento.

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Matriz	8	9.20094E+17	1.15012E+17	0.27	0.969
Error	18	7.77767E+18	4.32093E+17		
Total	26	8.69776E+18			

Figura 57. Análisis de varianza para *B. megaterium* (3 semanas)

El agrupamiento por Tukey no arrojó que alguno de los tratamientos presentara una diferencia significativa contra el resto, como se ve en la Figura 57, todos los grupos están contenidos en el grupo A, el único grupo, esto ilustra que todas las medias, en el análisis, no presentan diferencias entre ellas. También al observar la jerarquía del orden bajo el cual están acomodadas las medias se puede inferir que la matriz dos es la que mejor respuesta tiene, es decir, esa formulación permitió la obtención de buenos valores de viabilidad al pasar el tiempo establecido.

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Matriz	N	Mean	Grouping
2	3	570801000	A
5	3	533900217	A
4	3	523543597	A
8	3	440400633	A
0	3	373357067	A
7	3	186830037	A
3	3	160190293	A
6	3	120150150	A
1	3	80433967	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Figura 58. Agrupamiento utilizando el método de Tukey para *B. megaterium* (3 semanas)

La comparación entre las medias de viabilidad celular con respecto a los tratamientos aplicados muestra comportamientos, ya que se sabía con anterioridad que no había diferencia entre las medias encontradas, es por ello que todos los rangos incluyen el valor de cero en dicho gráfico que puede verse en la Figura 58. Algo similar se observa en el gráfico de los intervalos de confianza (Figura 59), pero individuales para cada tratamiento, donde es evidente la superposición de todos los tratamientos y el sobresaliente corresponde a la respuesta bajo la aplicación de la matriz 2.

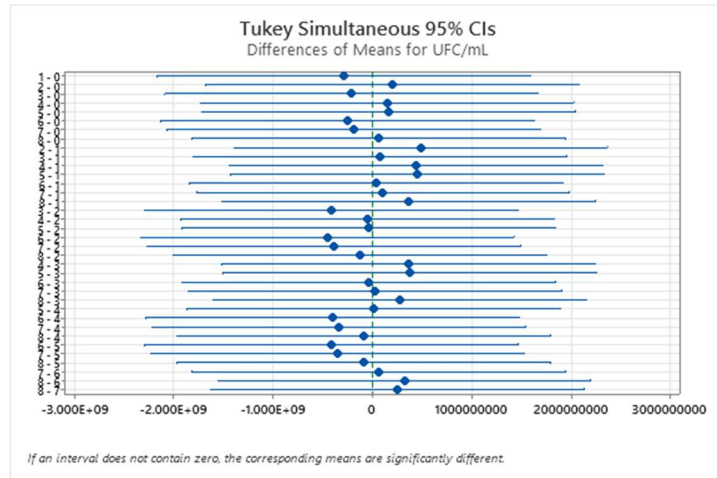


Figura 59. Intervalos de confianza simultáneos al 95% para *B. megaterium* (3 semanas)

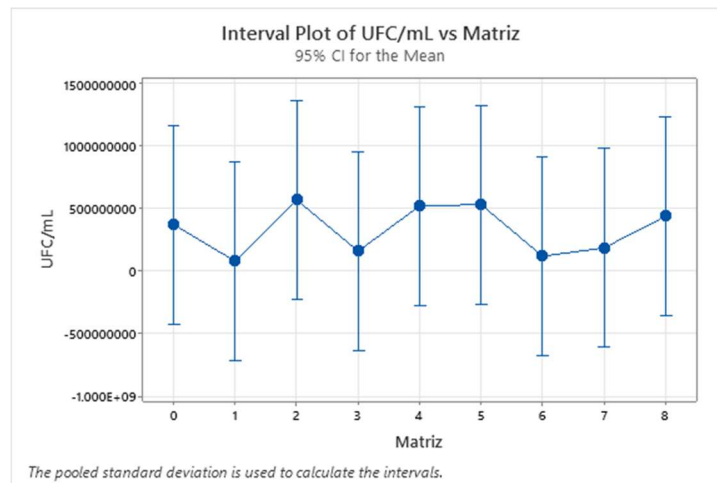


Figura 60. Intervalos de confianza para las medias de *B. megaterium* (3 semanas)

Observando la gráfica de residuos vs valores ajustados (Figura 60 – superior derecha) se puede determinar que la varianza de los residuos con respecto a los valores ajustados aumenta, aumentando a su vez la dispersión entre los residuos mismos, y el que presente una tendencia tan clara también no es un buen indicio de ajuste a los supuestos del modelo. El gráfico de normalidad (Figura 60 – superior izquierda) tampoco muestra un comportamiento óptimo que permitirá indicar un ajuste lineal de los residuos que a su vez demuestra una distribución normal de estos mismos.

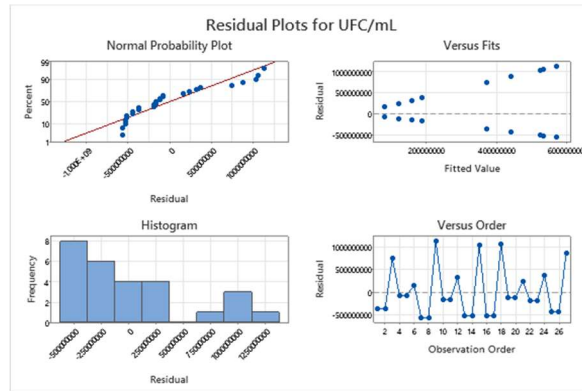


Figura 61. Diferentes gráficos residuales obtenidos para *B. megaterium* (3 semanas)

Para las matrices inoculadas con la misma cepa, pero con la diferencia del tiempo de conservación (6 semanas), se obtuvo un *p*-value de 0.978 aceptando, sin cuestionamientos, la hipótesis nula que establece que no existe diferencia entre las medias del estudio. El análisis de la varianza se muestra en la Figura 61.

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Matriz	8	1.61800E+18	2.02250E+17	0.24	0.978
Error	18	1.54249E+19	8.56938E+17		
Total	26	1.70429E+19			

Figura 62. Análisis de varianza para *B. megaterium* (6 semanas)

Ahora, haciendo noción del agrupamiento generado, se establece que no existe o que no hay diferencias significativas entre los ocho tratamientos, sin embargo, observando las medias obtenidas en la Figura 62, se puede considerar a la matriz cuatro como la mejor del resto debido al alto promedio de la viabilidad que presenta en la prueba realizada

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Matriz	N	Mean	Grouping
4	3	800303733	A
2	3	767701033	A
6	3	756667133	A
5	3	701000567	A
0	3	566843933	A
8	3	500600767	A
3	3	256993767	A
7	3	220233767	A
1	3	133867367	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Figura 63. Agrupamiento utilizando el método de Tukey para *B. megaterium* (6 semanas)

Se generaron también los gráficos de los intervalos de confianza simultáneos al 95% (Figura 63) y

también el de intervalos de confianza sin comparación entre muestras (Figura 64). De la primera de ellas se puede ver que las diferencias de las medias al comparar entre dos tratamientos diferentes se comportan de forma similar en todos los casos por lo que no hay una diferencia alguna entre uno y otro. Para el segundo gráfico se tiene una representación más visual de lo que se concluyó directamente de la prueba de Tukey, además de que pueden observarse los comportamientos de los demás tratamientos, por ejemplo, seguido de la matriz cuatro que sería como el primer lugar, puede decirse que la matriz dos cae en segundo lugar por una mínima variación de la media con respecto a la matriz seis.

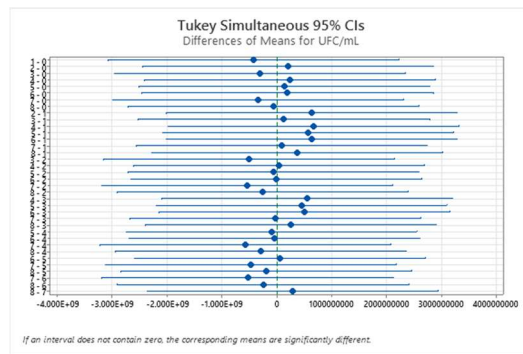


Figura 64. Intervalos de confianza simultáneos al 95% para *B. megaterium* (6 semanas)

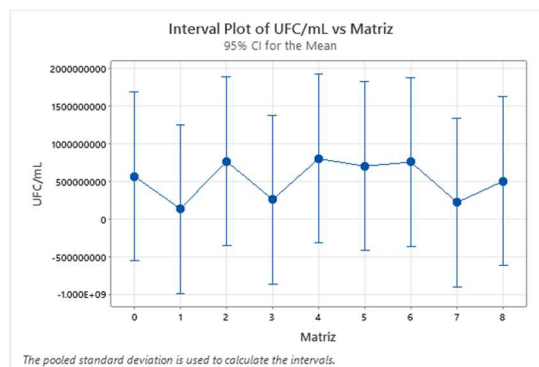


Figura 65. Intervalos de confianza para las medias de *B. megaterium* (6 semanas)

Resumiendo, los resultados observables en los gráficos residuales de la Figura 65 puede inferirse que los residuos no presentan un comportamiento que se considere bueno o el esperado para ninguno de los gráficos, esto puede deberse a que no existe una distribución normal entre los residuos (gráfico de probabilidad normal) ni presentan una variación constante contra valores ajustados (gráfico de residuos vs valores ajustados).

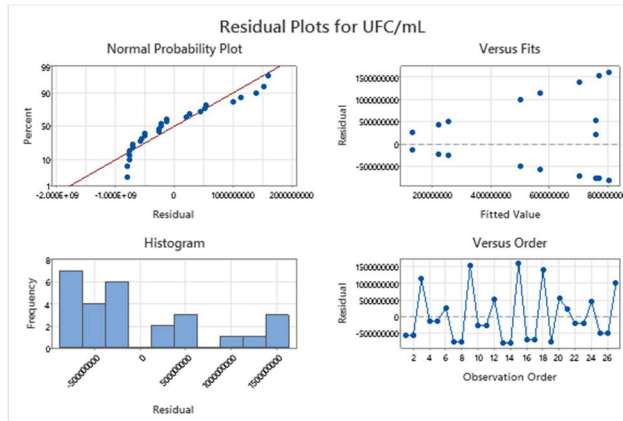


Figura 66. Diferentes gráficos residuales obtenidos para *B. megaterium* (6 semanas)

Las matrices inoculadas con *Pseudomonas aeruginosa* que fueron almacenadas durante tres semanas no mostraron diferencia significativa entre sus medias para poder determinar a la mejor formulación de las siete realizadas, esto es fácil de notar al observar el *p-value* (0.817) lo cual hace que no se pueda aceptar la hipótesis alternativa, como se ha notado en los casos anteriores de igual manera, dicho valor puede verse en la Figura 66 que corresponde al análisis de varianza.

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Matriz	8	2.33263E+17	2.91578E+16	0.53	0.817
Error	18	9.84625E+17	5.47014E+16		
Total	26	1.21789E+18			

Figura 67. Análisis de varianza para *P. aeruginosa* (3 semanas)

Ahora bien, al analizar con Tukey los resultados obtenidos de las UFC/ml (Figura 67) es observable que, efectivamente, estadísticamente no existe diferencia entre ellas, pero al poner atención al orden de acomodo de la tabla, contenida en la Figura 67, es posible decir que la media correspondiente a la matriz siete es la mayor de todas, pudiendo indicar que la formulación es buena y permite tener una buena viabilidad celular durante un periodo de tres semanas.

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Matriz N	Mean Grouping
7	3 283664133 A
1	3 236987233 A
2	3 110000000 A
3	3 96666733 A
4	3 53386757 A
5	3 46666670 A
6	3 33333343 A
0	3 20046813 A
8	3 3467100 A

Means that do not share a letter are significantly different.

Figura 68. Agrupamiento utilizando el método de Tukey para *P. aeruginosa* (3 semanas)

Observando la gráfica de intervalos de confianza simultáneos generados a un 95% del nivel de confianza (Figura 68) se infiere que, para las comparaciones entre grupos, los rangos bajo los cuales se analizan las medias del enfrentamiento no presentan diferencias significativas para ninguna de las comparaciones. Por otro lado, la gráfica de intervalos de confianza de las medias obtenidas (Figura 69) indica que, a pesar de no presentar una diferencia tan notoria, el tratamiento/formulación 7 es el que mejor respuesta obtiene, seguido del tratamiento/formulación 1, esto realizando la observación a tres semanas desde el tiempo inicial de conservación.

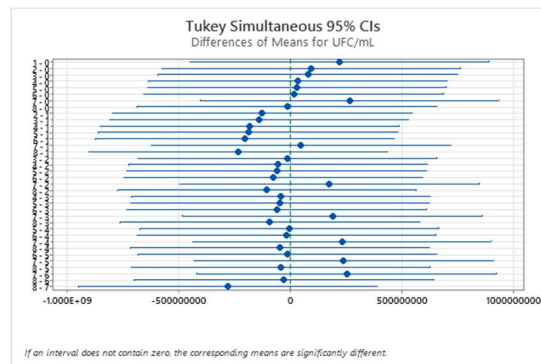


Figura 69. Intervalos simultáneos de confianza al 95% para *P. aeruginosa* (3 semanas)

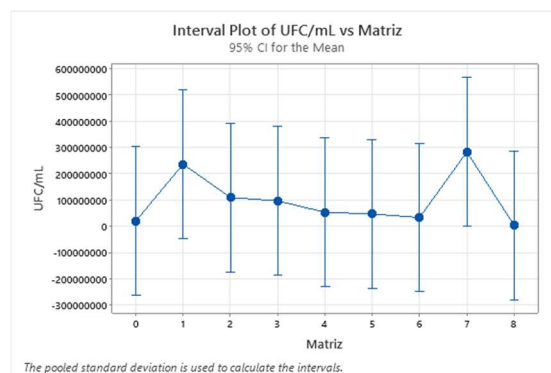


Figura 70. Intervalos de confianza para las medias de *P. aeruginosa* (3 semanas)

El comportamiento de la probabilidad normal para el microorganismo biocontrolador con relación a las formulaciones realizadas presenta valores atípicos debido a que se encuentran estos muy alejados de la línea de tendencia marcada en rojo, pero también hay unos que parecieran seguir dicha tendencia, sin embargo, no es posible decir que los residuos presenten una distribución enteramente normal. En el caso del histograma, dichos valores atípicos también son visibles ya que corresponden a la única barra que está alejada de las demás, lo cual les otorga una clasificación asimétrica a los residuos estandarizados. Por último, la gráfica de los residuos vs ajustes también aporta a indicar que no existe una variación constante de los residuos y se encuentran distribuidos de forma aleatoria. Todo esto se observa en la Figura 70.

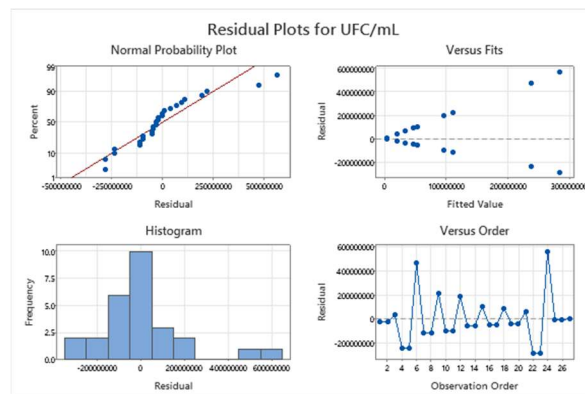


Figura 71. Diferentes gráficos residuales obtenidos para *P. aeruginosa* (3 semanas)

Continuando con el análisis de *Pseudomonas aeruginosa*, pero ahora con un periodo de almacenado de seis semanas se observa un cambio en la formulación que otorga la mejor viabilidad además de que se confirma que la tendencia sigue, es decir, no hay una diferencia significativa entre las medias de los datos que determiné a la mejor de todas ellas, confirmándose con el *p-value* (0.996) y la comparación de Tukey (Figura 71 y 72).

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Matriz	8	1.06113E+17	1.32642E+16	0.14	0.996
Error	18	1.71103E+18	9.50570E+16		
Total	26	1.81714E+18			

Figura 72. Análisis de varianza para *P. aeruginosa* (6 semanas)

Como fue estipulado anteriormente, hubo un cambio con respecto a la matriz que presentó una mejor viabilidad celular pasadas seis semanas de conservación, y corresponde al tratamiento número cuatro, cuando para el caso anterior había sido el número siete. Esta última pasó al puesto cuatro con respecto al promedio de la viabilidad.

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Matriz N	Mean	Grouping
4	3 260103507	A
8	3 234603800	A
0	3 203400227	A
7	3 184833533	A
5	3 176936667	A
1	3 156770600	A
2	3 153436667	A
3	3 70180017	A
6	3 63423360	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Figura 73. Agrupamiento utilizando el método de Tukey para *P. aeruginosa* (6 semanas)

Observando la gráfica de intervalos de confianza simultáneos generados a un 95% del nivel de confianza (Figura 73) se infiere que los intervalos para las comparaciones entre grupos, es decir, los rangos bajo los cuales se analizan las medias del enfrentamiento, no presentan diferencias significativas para ninguna de las comparaciones, de hecho hasta los valores de las medias estimadas son muy similares para todos los casos, inclusive hay una comparación (8-0) que tiene a su media estimada en cero, esto puede deberse a que hay valores de cero que no se eliminaron a manera de mantener la misma cantidad de población para todos los tratamientos además de que si se dio el caso donde no hubo crecimiento al momento de realizar el estriado en caja y por ende, no hubo un valor de viabilidad atribuido. Por otro lado, la gráfica de intervalos de confianza de las medias obtenidas (Figura 74) indica que, a pesar de no presentar una diferencia tan notoria, el tratamiento/formulación 4 es el que mejor respuesta obtiene, seguido del tratamiento/formulación 8, habiendo pasado seis semanas desde el inicio del almacenaje de los productos obtenidos.

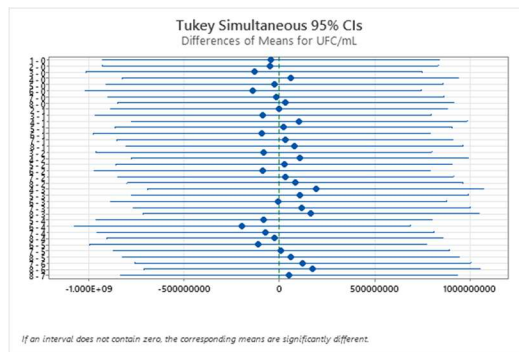


Figura 74. Intervalos de confianza simultáneos al 95 % para *P. aeruginosa* (6 semanas)

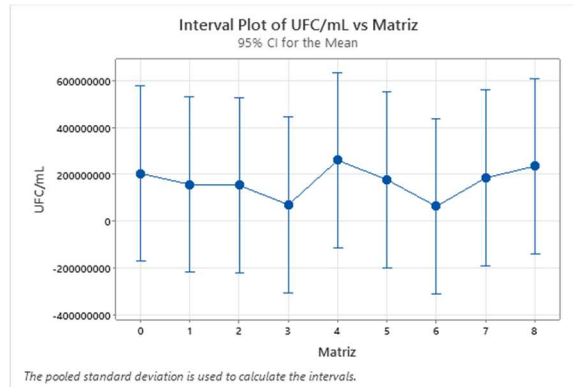


Figura 75. Intervalos de confianza para las medias de *P. aeruginosa* (6 semanas)

Tal como sucedió al realizar la comparativa a las tres semanas, se ve que el comportamiento de la probabilidad normal no sigue la tendencia lineal que se esperaría tener, sin embargo, hay datos que parecieran seguir dicha tendencia, más no es posible decir que los residuos presenten una distribución enteramente normal. En el caso del histograma, es claramente notorio que hay una asimetría total de los residuos estandarizados. Por último, la gráfica de los residuos vs ajustes también aporta a indicar que no existe una variación constante de los residuos y se encuentran distribuidos de forma aleatoria, esto se ve porque los datos están completamente espejados, que es exactamente lo que no debería de pasar. Todo esto se observa en la Figura 75.

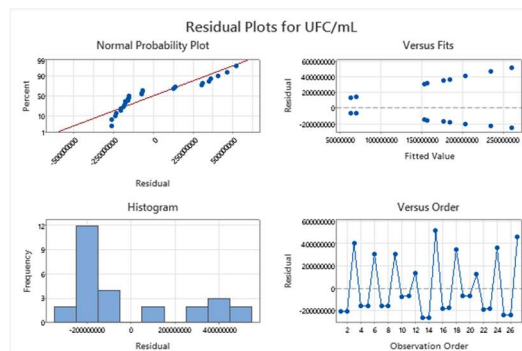


Figura 76. Diferentes gráficos residuales obtenidos para *P. aeruginosa* (6 semanas)

Como lo fue el caso de las matrices sólidas, las líquidas mostraron de igual manera un comportamiento bueno, es decir, la viabilidad del biocontrolador es buena transcurridas tanto tres como seis semanas, y si existe un cambio de las matrices con mejores resultados al paso del tiempo. Es importante continuar con la experimentación y tratar de aumentar el tamaño de muestra y así obtener valores más precisos.

2. Productos

A continuación, se muestran las fichas descriptivas de los productos mínimos viables elaborados

Nombre y código del PAP (como en la carátula):	PAP4D09A PAP PROGRAMA DE DESARROLLO TECNOLÓGICO PARA LA SUSTENTABILIDAD AMBIENTAL ENERGÉTICA Y ALIMENTARIA I
Nombre del sub proyecto (como en la carátula):	4D09B Biocontrol
Nombre del producto:	Microencapsulado de alginato con cepa <i>Bacillus subtilis</i>
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Perlas de alginato de sodio al 4% como propuesta de matriz sólida que contienen células de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> como agentes biocontroladores.
Autores:	Ximena De Unaánue y Lizbeth Valenzuela

Nombre y código del PAP (como en la carátula):	PAP4D09A PAP PROGRAMA DE DESARROLLO TECNOLÓGICO PARA LA SUSTENTABILIDAD AMBIENTAL ENERGÉTICA Y ALIMENTARIA I
Nombre del sub proyecto (como en la carátula):	4D09B Biocontrol
Nombre del producto:	Microencapsulado de alginato con cepa <i>Bacillus megaterium</i>
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Perlas de alginato de sodio al 4% como propuesta de matriz sólida, que contienen células de la bacteria <i>Bacillus megaterium</i> como agentes biocontroladores.
Autores:	Ximena De Unánue y Lizbeth Valenzuela

Nombre y código del PAP (como en la carátula):	PAP4D09A PAP PROGRAMA DE DESARROLLO TECNOLÓGICO PARA LA SUSTENTABILIDAD AMBIENTAL ENERGÉTICA Y ALIMENTARIA I
Nombre del sub proyecto (como en la carátula):	4D09B Biocontrol
Nombre del producto:	Microencapsulado de alginato con <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Células de la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> contenidas en perlas de alginato de sodio al 4% como propuesta de matriz sólida para su uso como product biocontrolador.
Autores:	Ximena De Unánue y Lizbeth Valenzuela

Nombre y código del PAP (como en la carátula):	PAP4D09A PAP PROGRAMA DE DESARROLLO TECNOLÓGICO PARA LA SUSTENTABILIDAD AMBIENTAL ENERGÉTICA Y ALIMENTARIA I
Nombre del sub proyecto (como en la carátula):	4D09B Biocontrol
Nombre del producto:	Microencapsulado de alginato con suero de leche como sustrato para <i>Bacillus subtilis</i>
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Células de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> contenidas en perlas hechas de solución compuesta de suero de leche dulce y alginato de sodio al 4% como propuesta de matriz sólida para su uso como product biocontrolador.
Autores:	Ximena De Unánue y Lizbeth Valenzuela

Nombre y código del PAP (como en la carátula):	PAP4D09A PAP PROGRAMA DE DESARROLLO TECNOLÓGICO PARA LA SUSTENTABILIDAD AMBIENTAL ENERGÉTICA Y ALIMENTARIA I
--	--

Nombre del sub proyecto (como en la carátula):	4D09B Biocontrol
Nombre del producto:	Microencapsulado de alginato con suero de leche como sustrato para <i>Bacillus megaterium</i>
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Células de la bacteria <i>Bacillus megaterium</i> contenidas en perlas hechas de solución compuesta de suero de leche dulce y alginato de sodio al 4% como propuesta de matriz sólida para su uso como product biocontrolador.
Autores:	Ximena De Unánue y Lizbeth Valenzuela

Nombre y código del PAP (como en la carátula):	PAP4D09A PAP PROGRAMA DE DESARROLLO TECNOLOGICO PARA LA SUSTENTABILIDAD AMBIENTAL ENERGETICA Y ALIMENTARIA I
Nombre del sub proyecto (como en la carátula):	4D09B Biocontrol
Nombre del producto:	Microencapsulado de alginato con suero de leche como sustrato para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Células de la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> contenidas en perlas hechas de solución compuesta de suero de leche dulce y alginato de sodio al 4% como propuesta de matriz sólida para su uso como product biocontrolador.
Autores:	Ximena De Unánue y Lizbeth Valenzuela

Nombre y código del PAP (como en la carátula):	PAP4D09A PAP PROGRAMA DE DESARROLLO TECNOLOGICO PARA LA SUSTENTABILIDAD AMBIENTAL ENERGETICA Y ALIMENTARIA I
Nombre del sub proyecto (como en la carátula):	4D09B Biocontrol
Nombre del producto:	Matrices líquidas con NPK y suero de leche para <i>Bacillus subtilis</i>

Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Matriz líquida hecha a partir de una solución de glicerol, suero de leche adicionada con nitrógeno, fósforo y potasio como fuentes adicionales de nutrientes para plantas, además de células de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> como el principal agente biocontrolador.
Autores:	Ximena De Unánue y Lizbeth Valenzuela

Nombre y código del PAP (como en la carátula):	PAP4D09A PAP PROGRAMA DE DESARROLLO TECNOLOGICO PARA LA SUSTENTABILIDAD AMBIENTAL ENERGETICA Y ALIMENTARIA I
Nombre del sub proyecto (como en la carátula):	4D09B Biocontrol
Nombre del producto:	Matrices líquidas con NPK y suero de leche para <i>Bacillus megaterium</i>
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Matriz líquida hecha a partir de una solución de glicerol, suero de leche adicionada con nitrógeno, fósforo y potasio como fuentes adicionales de nutrientes para plantas, además de células de la bacteria <i>Bacillus megaterium</i> como el principal agente biocontrolador.
Autores:	Ximena De Unánue y Lizbeth Valenzuela

Nombre y código del PAP (como en la carátula):	PAP4D09A PAP PROGRAMA DE DESARROLLO TECNOLOGICO PARA LA SUSTENTABILIDAD AMBIENTAL ENERGETICA Y ALIMENTARIA I
Nombre del sub proyecto (como en la carátula):	4D09B Biocontrol
Nombre del producto:	Matrices líquidas con NPK y suero de leche para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Matriz líquida hecha a partir de una solución de glicerol, suero de leche adicionada con nitrógeno, fósforo y potasio como fuentes adicionales de nutrientes para plantas, además de células de la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> como el principal

	agente biocontrolador.
Autores:	Ximena De Unánue y Lizbeth Valenzuela

- Presenta el producto de acuerdo con su tipología:
 - Modelo o prototipo

Lean canvas de MVP Matrices sólidas

LIENZO LEAN CANVAS: El potencial de negocio para una idea en fase temprana.				
Problema Disminuir y/o el uso de fungicidas para el tratamiento de enfermedades en plantas.	Solución <ul style="list-style-type: none"> • Reutilización de residuos alimenticios • Métodos menos dañinos con el medio ambiente • Agricultura más sostenible 	Propuesta de Valor Al optar por nuevas formas de control de plagas permite la innovación de diferentes técnicas que además permiten la integración e inclusión de mas sectores contribuyentes, como la industria alimenticia, fomentando una economía más circular al mismo tiempo en el que se reutilizan los desechos generados por la misma.	Ventaja Injusta Aprovechamiento de residuos provenientes de la industria alimentaria	Segmento de Clientes Personas que tengan plantas que buscan alternativas al uso de agroquímicos para control de plagas en cultivos. Clientes tempranos Personas con pequeños huertos domésticos buscando novedades para el control de plagas.
	Métricas Claves <ul style="list-style-type: none"> • Ventas • Nuevos clientes • Concurrencia en página web 	Enunciado de alto valor Reintegrando y cooperando por una agronomía más amigable para el mundo y para todos.	Canales <ul style="list-style-type: none"> • Internet • <i>Retail</i> en tiendas especializadas. • Publicidad 	
Estructura de Costos <ul style="list-style-type: none"> • Materia prima • Página web • Sueldos • Logística de envíos • Desarrollador de página web • Marketing y publicidad 			Fuentes de Ingreso <ul style="list-style-type: none"> • Ventas físicas (tiendas) • Ventas online • Talleres de uso de producto 	

Lean canvas de MVP Matrices líquidas

LIENZO LEAN CANVAS: El potencial de negocio para una idea en fase temprana.				
Problema Disminuir y/o el uso de fungicidas para el tratamiento de enfermedades en plantas.	Solución <ul style="list-style-type: none"> Reutilización de residuos Suplementos nutricionales claves para la planta Agricultura más sostenible. 	Propuesta de Valor Al optar por nuevas formas de control de plagas permite la innovación de diferentes técnicas que además permiten la integración e inclusión de más sectores contribuyentes, como el de la industria alimenticia, fomentando una economía más circular al mismo tiempo en el que se reutilizan los desechos generados por la misma.	Ventaja Injusta Aprovechamiento de residuos provenientes de la industria alimentaria	Segmento de Clientes Personas que tengan plantas que buscan alternativas al uso de agroquímicos para control de plagas en cultivos.
	Métricas Claves <ul style="list-style-type: none"> Ventas Nuevos clientes Concurrencia en página web 	Enunciado de alto valor Reintegrando y cooperando por una agronomía más amigable para el mundo y para todos.	Canales <ul style="list-style-type: none"> Internet <i>Retail</i> en tiendas especializadas. Publicidad 	Clientes tempranos Personas con pequeños huertos domésticos buscando novedades para el control de plagas y/o suplementos alimenticios para las plantas
Estructura de Costos <ul style="list-style-type: none"> Materia prima Página web Sueldos Logística de envíos Desarrollador de página web Marketing y publicidad 			Fuentes de Ingreso <ul style="list-style-type: none"> Ventas físicas (tiendas) Ventas online Talleres de uso de producto 	

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

Ximena De Unánue Gutiérrez:

El PAP se centró en hacer frente a problemas relacionados con la sustentabilidad ambiental energética y alimentaria, más específicamente en el biocontrol, siendo éste importante debido a su relación con la agricultura y las dificultades que se viven en ese sector, sobre todo en cuanto a plagas y enfermedades en cultivos, perdiendo de esta manera tanto parte de la cosecha como valor monetario, así como la amplia contaminación que se genera a partir de productos químicos que buscan erradicar lo previamente mencionado. Podemos observar que buscando erradicar problemas, se presentan otros peores, en este caso alcanzando cambios climáticos debido al abuso y gran consumo de agroquímicos en el país, afectando así otras especies y hasta el mismo suelo.

A su vez, se comprendió la necesidad de realizar productos que mejoren la viabilidad celular, pero que de igual manera éstos no sean difíciles de formular, y que tal formulación tenga una base y explicación de por qué se decidió así. Siendo tal que las formulaciones propuestas son más amigables con el medio ambiente, dejando de lado aquellos tratamientos agresivos y permitiendo la obtención de un MVP.

En cuanto al área biotecnológica, personalmente pude aprender más en cuanto a la búsqueda y resolución de problemas, adquisición de literatura externa y estudio de los propios microorganismos utilizados con el fin de proponer soluciones ante problemáticas que se iban presentando, pudiendo unir, finalmente, lo experimental y lo investigado de una manera más vasta. Finalmente, pude apreciar de una manera más tangible la responsabilidad como biotecnólogo y el desarrollo de los proyectos dentro de esta área que pueden proveer de ventajas a la sociedad.

Lizbeth Valenzuela Rodriguez:

Como es conocido mundialmente, nuestro país es uno de los principales productores agrícolas de una gran variedad de cultivos, por lo que a lo largo del tiempo se han tenido que ir buscando alternativas para su cuidado, y una de esas alternativas reside en el biocontrol, la cual ha ido adquiriendo popularidad ya que es una forma novedosa de cuidar a las cosechas sin la necesidad, o disminuyendo también, el uso de químicos o de otras sustancias que pueden llegar a ser dañinas para el consumidor además de que en la mayoría de los casos pueden tener costos sumamente elevados, es por esto último que también se implementó el uso de residuos provenientes de la industria alimentaria, en este caso el suero de leche obtenido durante la elaboración de queso, a manera de darle un nuevo uso y apoyar a la reutilización de los desechos, proponiendo de igual manera que se logró una economía más circular, donde varios sectores se beneficien directamente uno del otro, este fue utilizado a manera de permitir que las cepas utilizadas en el proyecto fueran más viables por mayor tiempo, es decir, que tuvieran una mayor vida con el paso de tiempo y ver qué tan viable fueron las formulaciones realizadas, lo cual podría ayudar más adelante con el diseño completo del producto.

Resultó interesante pensar como desde un punto de vista biotecnológico, aplicando, a mi parecer, lo más básico y de lo cual nace la carrera, puedo implementar una serie de técnicas que puedan ser replicables para que, si más personas desean utilizar nuestro protocolo, tengan un producto viable, además de que fue mi primer acercamiento a como un proyecto puede impactar en la sociedad. Durante el trayecto también surgieron muchas dudas e inquietudes que pudimos ir corrigiendo y resolviendo gracias al trabajo en equipo que, en lo personal, nutrió muchísimo el proyecto porque se pudo englobar de una forma más extensa a como si solo una persona estuviera a cargo del proyecto, y permitió nutrir mucho más el trabajo.

3.2 Aprendizajes logrados

Ximena De Unánue Gutiérrez:

En el presente PAP pude practicar técnicas de microbiología vistas al inicio de la carrera, pensando que éstas se encontraban olvidadas cuando realmente no fue así. Por su parte, al trabajar de manera independiente pude tener más confianza en mí y en mis técnicas de manejo de los materiales y equipos, así como de los mismos microorganismos utilizados. Por su parte, pude adquirir más conocimientos a partir de otros protocolos recuperados de la literatura y hacerles frente a las problemáticas surgidas. En un principio fue complicado el saber por dónde se iba a comenzar y sobre todo cómo formular un producto funcional para lo que se buscaba resolver, sin embargo, una vez avanzado el proyecto fue posible entender que esto no es tan difícil, tan sólo se debe tener una buena base de investigación previa y estar atento a cualquier incierto que surja para su pronta resolución.

Mencionado lo anterior, puedo establecer que aprendí más de la búsqueda de soluciones y esto me generó valentía al momento de equivocarme, ya que muchas veces de estos mismos errores se generaba un mayor conocimiento y entendimiento del tema. Por su parte, al trabajar en equipo pude aprender más de mi compañera e incluso del manejo de tiempos según los objetivos planteados para el proyecto.

Por otro lado, aprendí más sobre el análisis y diseño de experimentos, comprendiendo las herramientas computacionales a utilizar y cómo pueden mostrar de una manera más visual el proyecto completo para su posterior estudio y representación, específicamente en este caso, permitió la comparación de los tratamientos y la decisión de cuál era mejor según lo inferido.

Lizbeth Valenzuela Rodríguez:

De los principales aprendizajes que me ha dejado este PAP ha sido la administración del tiempo y como es que se organizan todas las actividades para el cumplimiento de los objetivos, además de que durante todo el proceso del desarrollo del proyecto tuvimos que replantear ciertos objetivos lo cual hizo que cambiáramos técnicas, incluso la propia metodología, pero creo que de eso trata este tipo de experiencias, de expandir tus conocimientos y no encasillarte a un solo método. Bajo el objetivo del proyecto, aprendí también tanto a plantear como diseñar distintas formulaciones basadas en investigaciones con objetivos similares a los propios del proyecto, también aprendí una nueva técnica, el microencapsulado, que jamás había realizado ni si quiera escuchado que se hiciera para microorganismos, solamente en alimentos, además de como determinar el método bajo el cual se analizarán los productos finales.

Otro de los aspectos importantes que pude retomar fue el diseño de experimentos y la interpretación de datos, lo cual tenía un poco abandonado desde que tomé la clase de diseño de experimentos en cuarto semestre y no fue hasta este semestre que lo retomé, lo cual me llevó a pensar que para estos proyectos realmente utilizas todos los materiales que vas adquiriendo a lo largo de la carrera.