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 I

ITESO, Universidad Jesuita de Guadalajara

PAP4D08 B

Encapsulamiento de especies bacterianas del género *Bacilus* como propuesta de agentes promotores de crecimiento vegetal y control biológico contra la especie fitopatógena *Pectobacterium betavasculorum*

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en Biotecnología, Juan Manuel Alejandro Flores Martínez

Ing. en Biotecnología, Scarlett Frausto Trigo

Ing. en Biotecnología, Marcelo Gallardo Rodríguez

Profesor PAP: Dr. Alejandro Arana Sánchez

Tlaquepaque, Jalisco, mayo 2023

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP 2
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional 2
Resumen 4
1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional 4
1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto 5
1.2 Caracterización de la organización 9
1.3 Identificación de la(s) problemática(s) 10
1.4. Planeación de alternativa(s) 11
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora 14
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos 29
1.7. Bibliografía y otros recursos 32
1.8. Anexos generales ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2. Productos 34
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia 35
3.1 Sensibilización ante las realidades 35
3.2 Aprendizajes logrados 38

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

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

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

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

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

El Reporte PAP consta de tres componentes:

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

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

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

Resumen

El presente Proyecto de Aplicación Profesional “Encapsulamiento de especies bacterianas del género *Bacillus* como propuesta de agentes promotores de crecimiento vegetal y control biológico contra la especie fitopatógena *Pectobacterium betavasculorum*”, surge como continuación del proyecto global aprobado en el 2020 por el Fondo de Apoyo a la Investigación, titulado “Aislamiento e identificación de microorganismos con potencial para bio-control”. Además, es continuación de un PAP de otoño 2022.

Se busca el desarrollo de un método de encapsulamiento de bacterias del género *Bacillus* para su uso como promotores de crecimiento vegetal y control biológico. Se realizó la formulación de una matriz líquida compuesta de alginato de sodio y aditivos para encapsular cuatro especies bacterianas: *B. megaterium, B. vallismortis, B. subtilis* y *B. pumilus*. La viabilidad del consorcio de cepas provenientes de las cápsulas fue de 8900 UFC/mL. Para las cápsulas de alginato de *B. subtilis* y *B. megaterium,* obtenidas en una etapa previa del proyecto, fue 4900 y 6600 UFC/mL por cada gramo de capsulas, respectivamente. Las pruebas comparativas de la actividad inhibitoria de *B. subtilis* y un consorcio de las cuatro especies de *Bacillus* contra *P. betavasculorum,* demostraron una fuerte inhibición sobre el fitopatógeno. Además, se determinó que el diámetro de las cápsulas era de 1,5045.45 µm, grosor de 125 µm y volúmenes internos y externos de 0.01544 cm^3 y 0.01199 cm^3, respectivamente.

En conjunto, este proyecto representa un avance en el desarrollo de soluciones biotecnológicas para el control de enfermedades en cultivos y la promoción del crecimiento vegetal.

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 construir 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 presente proyecto se realiza en el Parque Tecnológico del ITESO dependiente del Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales (DPTI). Es un proyecto experimental cuyo objetivo general es desarrollar encapsulamientos con bacterias del género *Bacillus* para su uso como promotores de crecimiento vegetal y control biológico contra la especie fitopatógena *Pectobacterium betavasculorum*.

Los objetivos específivos son:

- Establecer la formulación para el encapsulamiento de las bacterias
- Encapsular un consorcio de bacterias del género *Bacillus* con alginato de sodio.
- Medir el efecto del uso de los encapsulados como controladores biológicos en cultivos celulares *in vitro* contra *Pectobacterium betavasculorum*.
- Comparar la viabilidad celular de las bacterias antes y después del tratamiento de encapsulamiento en ambiente *in vitro*.
- Realizar pruebas de vida de anaquel acelerada del producto.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

En la actualidad, la agricultura en México es un sector productivo importante pues el territorio nacional cuenta con 198 millones de hectáreas de las cuales 145 millones (73%) se dedican a la actividad agropecuaria. Aunque su participación en el PIB es del 3.7%, la agricultura emplea al 13% de la población mexicana [1].

La producción agrícola en México se caracteriza por un bajo rendimiento y una disminución en la población agrícola, por lo que es importante desarrollar programas para la reducción de la pobreza y el aumento de productividad y competitividad impactando directamente en el desarrollo económico [1]. De esto se deriva la importancia de tecnologías que aprovechen a los microorganismos competitivos naturales de las plagas para reducir dichas poblaciones sin afectar la producción agrícola [2].

El control biológico es una tecnología innovadora que no impacta negativamente al medio ambiente y protege la salud pública, efecto contrario a los plaguicidas agroquímicos. En México existe el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), el cual se encarga de desarrollar y establecer estrategias de control biológico para plagas reglamentadas, contribuyendo así a fortalecer la sanidad de los cultivos vegetales en nuestro país, y a su vez al incremento tanto de la productividad como de la calidad agrícola [2].

Una de las propuestas para el control biológico de cultivos agrícolas es la microencapsulación que es una tecnología de empaquetamiento de sustancias químicas y materiales biológico conformada por partículas con una membrana polimérica. Encapsular microorganismos permite el aislamiento físico y proporciona protección contra factores ambientales o fisicoquímicos del ambiente, como dentro del suelo, y la liberación gradual del agente encapsulado.Este tipo de técnicas de encapsulamiento tiene potencial de uso en la industria farmaceútica, alimenticia, médica y agrícola [3].

En la microencapsulación de microorganismos se utiliza alginato como membrana polimérica pues forma una matriz altamente versátil, biocompatible y no tóxica para componentes activos, células o microorganismos sensibles al calor, pH, oxígeno y luz. El alginato es un compuesto de bajo costo, biodegradable y con capacidad de liberar de manera lenta agentes encapsulados. El alginato de calcio, cuya estructura se muestra en la figura 1, es el más utilizado para la microencapsulación [3].

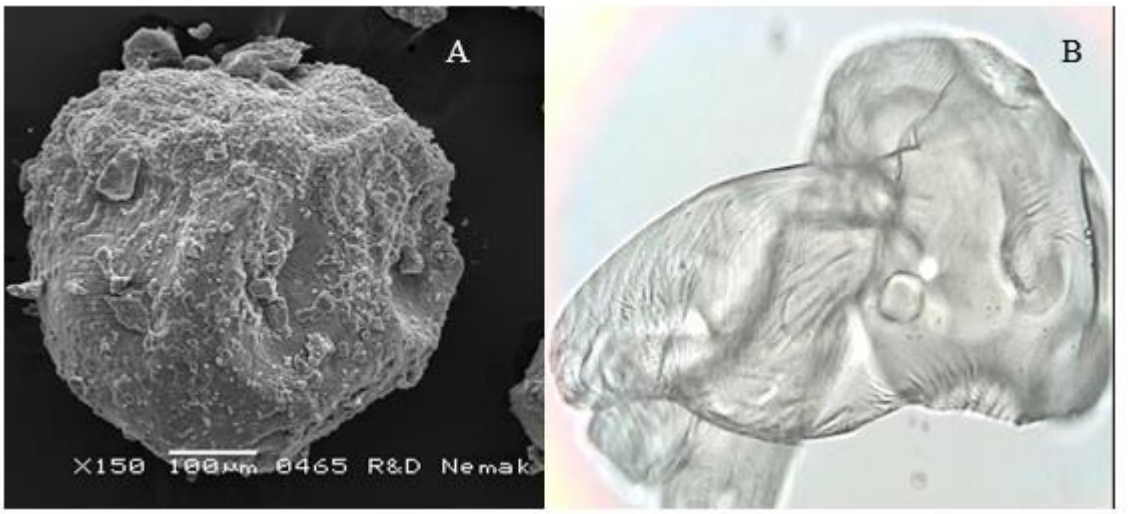


Figura 1. Microfotografía óptica (A) y de barrido (B) de partículas de alginato de calcio. En la microfotografía de barrido se realizó una deshidratación lo cual causó deformaciones [6].

Género Bacillus

Las bacterias del género *Bacillus* se utilizan en los sistemas agrícolas debido a sus aplicaciones en el control de enfermedades de cultivos vegetales por su habilidad de formar endosporas, lo cual les da resistencia y propicia su aislamiento en diversos hábitats e incluso en ambientes bajo condiciones extremas. Entre las características de este género, se encuentra su capacidad para crecimiento aerobio, son bacterias Gram positivas con una morfología bacilar, cuentan con movilidad flagelar y un tamaño variable entre 0.5 a 10 µm, su pH óptimo para crecimiento es 7.0, además de que su metabolismo está asociado a la promoción del crecimiento vegetal y del control de patógenos [4]. Algunos de las especies más utilizadas en los sistemas agrícolas son *B. subtilis*, *B. megaterium* y *B. pumilus*.

Bacillus subtilis

Bacillus subtilis es la especie más estudiada del género *Bacillus* debido a su fácil modificación genéticay la esporulación; se utiliza en la producción de enzimas, fermentación de alimentos y control biológico de plantas. Es ampliamente estudiada debido a ser un microorganismo modelo para el estudio de la división celular, secreción de proteínas, desarrollo de biopelículas, unión a la raíz de la planta o las hifas fúngicas, la producción de

metabolitos secundarios, el intercambio de citoplasma a través de nanotubos intercelulares, etc. [5].

Bacillus megaterium

Bacillus megaterium es una bacteria de gran tamaño celular midiendo 4 x 1-5 µm en promedio, de ahí su nombre. Al igual que otras especies del género Bacillus, esta genera esporas y se caracteriza por ser ubicua, además de presentar altos niveles de resistencia intrínseca a condiciones hostiles, como la exposición a metales y altas concentraciones salinas. En la agricultura se utiliza como biofertilizador para mejorar el crecimiento y rendimiento de los cultivos debido a su propiedad de solubilizar el fosfato [6].

Bacillus pumilus

Al igual que las especies anteriormente mencionadas, se ha utilizado como promotora del crecimiento vegetal, se encontró que produce ácido indolacético, que ayuda a la figación de nitrógeno en los cultivos vegetales. La producción de ácido indolacético promueve el crecimiento de raíces, también ayuda a controlar los procesos de crecimiento vegetativo y afecta positivamente la fotosíntesis [7].

Pudrición blanda

La pudredumbre blanda bacteriana se considera una de las causas de mayores pérdidas económicas en la agricultura mundial, afectando a frutales, cereales, vegetales y ornamentales. Las bacterias del género *Pectobacterium* y *Dickeya* son conocidas como enterobacterias de la podredumbre blanda, siendo más agresivas y efectivas para causar la enfermedad debido a su capacidad de sintetizar una gama más amplia de complejos enzimáticos [8]. Se ha encontrado relación entre la pudrición blanda y *Pectobacterium betavasculorum* [9].

El presente Proyecto de Aplicación Profesional (PAP) considera el contexto ya mencionado y es continuidad de trabajos realizados de semestres anteriores. En el semestre de Otoño 2022 se llevó a cabo la formulación de una matríz líquida por parte del equipo de las estudiantes de Ingeniería en Biotecnología Lizbeth Valenzuela Rodríguez y Ximena de Unánue

Gutiérrez, encargadas de la identificación de las cepas por MALDI-TOF así como de la formulación de producto en matriz líquida. En el mismo semestre se hizo la formulación de producto de matriz sólida a cargo del equipo de Alejandra Figueroa Esqueda y Astrid Samara Vázquez de la Torre, al igual que en los proyectos anteriores que aislaron e identificaron las bacterias utilizadas.

1.2 Caracterización de la organización

La investigación en el ITESO se estructura a través del Programa Formal de Investigación (PFI). El PFI articula el conjunto de líneas y productos 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 [10].

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 [10]:

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 [10].

2. Alimentos: estudiar productos agropecuarios del occidente de México que potencialmente contenga 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 menos 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 desminuir su impacto ambiental [10].

3. Medio ambiente: mejorar el conocimiento sobre los servicios de econsistemas 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 [10].

El presente proyecto es parte del PAP de Desarrollo Tecnológico para la Sustentabilidad Ambiental, Energética y Alimentaria I y está enfocado en el escenario de control biológico, siendo asesorado por el Dr. Alejandro Arana Sánchez. Las investigaciones llevadas a cabo en los Proyectos de Aplicación Profesional anteriores posibilitaron el actual planteamiento de la formulación de un producto mínimo viable en base a microorganismos del género *Bacillus*, realizando las actividades correspondientes en los laboratorios de biotecnología del Parque Tecnológico del ITESO.

1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

Los plaguicidas y fertilizantes tienen un efecto adverso en los cultivos vegetales, por eso se ha propuesto reducir al mínimo dichos impactos. La demanda de estos compuestos ha crecido a un ritmo de 4.1 % anual, debido al incremento en la necesidad de cultivos agrícolas que

abastezcan los bienes y servicios contemporáneos. Debido a que la demanda tienda al aumento, los efectos adversos para la salud y el medio ambiente son cada vez más evidentes, pues se estiman que se han producido 385 millones de casos de envenenamiento involuntario y no mortal por plaguicidas, de los que se derivan aproximadamente 11,000 muertes [11].

El uso de hongos, bacterias y otros organismos antagonistas competidores desplazarán a los agroquímicos debido a su capacidad de controlar a las plagas agrícolas. Por la naturaleza de los agentes biológicos, pueden ser usados en las prácticas de agricultura sustentable, es decir, con una menor dependencia de insecticidad químicos. Esta estrategia es una alternativa atractiva ya que los organismos antagónicos se degradan en el medio ambiente y no se acumulan en el tejido vegetal [12].

1.4. Planeación de alternativa(s)

Dando seguimiento a trabajos anteriores para el desarrollo e implementación de un producto viable de control biológio y el aumento de la viabialidad celular, en el presente PAP se busca una nueva formulación que logre dicho propósito. En una etapa previa, se logró mantener la viabilidad celular de *B. megaterium* en presencia de alginato a una concentración de 1.4% y de *B. subtillis*.a una concentración de 3.0%

Para preservar y almacenar distintos productos de comercialización biotecnológica, entre ellos los fertilizantes microbiológicos, es necesario el aumento de la vida de anaquel, factor limitante en dicho cometido [13]. Esto se puede lograr manteniendo el producto en estado líquido y bajo refrigeración, congelamiento con la presencia de sustancias crioprotectoras o manteniendo el producto deshidratado [13]. La deshidratación es considerada como uno de los enfoques más práticos gracias a su fácil manipulación, almacenaje y distribución. Sin embargo, la liofilización es considerado el método más eficiente para el mantenimiento de la viabilidad celular, aunque sus costos son elevados [13]. A nivel industrial, los métodos más utilizados son el secado por pulverización o el lecho fluidizado aunque este primero provoca una gran pérdida en la vialididad de algunos microorganismos Gram negativos [13].

Por el otro lado, el encapsulamiento de microorganimos es una alternativa que favorece su protección cuando se encuentran en el suelo. Entre los materiales utilizados para el encapsulamiento, el alginato es el más utilizado. A pesar de que esta técnica proporciona estabilidad, el alto costo al momento de su aplicación a larga escala produce limitaciones para la industria, por lo que es importante adicionar componentes que permitan su correcto funcionamiento y disminución de costos [14].

Respecto a la adición de componentes durante el proceso de encapsulamiento, en el presente trabajo se optó por una mezcla de alginato, almidón y ácido húmico. Se eligió el alginato para mantener la continuidad con los trabajos previos ya mencionados. El almidón fue seleccinado debido a que proporciona estructura y resistencia a la cápsula, además de soporte para el microorganismo, resultando en un reactivo bastante atractivo debido a su bajo costo. Por último, el ácido húmico es un estimulador biológico de plantas y actividades microbiológicas. El almidón y el ácido húmico son componentes agregados en este PAP con respecto a los proyectos anteriores.

Las microcápsulas resultantes de nuestra alternativa seleccionada contarán con propiedades que les otorgarán resistencia al medio donde se almacenen junto a componentes que estimulen biológicamente a los microorganismos encapsulados, además de ofrecer una correcta desencapsulación dentro del suelo agrícola debido a la biocompatibilidad de su formulación, la cual se compone de: alginato al 2%, almidón al 5% y ácido húmico al 1%, todos en una relación de p/v. El inóculo está conformado por una relación v/v al 1% con una concentración estimada de $1x10^9$ células por mililitro del medio, o mayor. La eficiencia del potencial como agente de control biológico será evaluado en cultivos donde crecerá en condiciones competitivas junto al fitopatógeno *Pectobacterium betavasculorum* en pruebas *in vitro*.

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

Tabla 1. Cronograma de actividades previstas para la realización del PAP.

Nombre de la actividad	Recursos	Tiempo (días)	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11	Semana 12	Semana13	Semana 14	Semana 15	Semana 16
Estandarización de proceso	TP AA	6																
Activación de cepas	TP AA	4																
Encapsulamiento: pruebas de concepto	TP AJ	3																
Encapsulamiento: formulación final	TP BP	3																
Encapsulamiento: pruebas *in vitro*	TP	8																
Análisis de patogenicidad de cepa problema	TP	2																
Análisis de vida de anaquel acelerada	TP VA	2																
Análisis de la estructura del encapsulado	TP MB	1																
Presentar el avance 4 al director																		
Presentación final oral																		

La tabla 3 muestra el significado de las abreviaturas utilizadas para referir a los recursos necesarios en cada una de las distintas actividades planeadas.

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

Recursos utilizados	
Abreviatura	*Significado*
AA	Asesoría Dr. Alejandro Arana
AJ	Asesoría Dr. José Rodríguez
TP	Trabajo personal
MB	Microscopio electrónico de barrido
VA	Laboratorio de vida acelerada de anaquel
BP	Bomba peristáltica

1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

Propagación y corroboración de las cepas del género Bacillus y Pectobacterium.

Las especies bacterianas cuentan con requisitos nutricionales mínimos para su crecimiento, dentro de los cuales se incluyen el agua, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y algunas sales inorgánicas. Se trata de uno de los géneros más versátiles que puede hacer uso de una amplia variedad de fuentes de carbono, incluyendo azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos. Todos los nutrientes entran en la célula a través del agua, que también sirve para eliminar los productos de desecho [15].

Para el crecimiento de las bacterias seleccionadas, se utilizó el medio LB (caldo de lisogenia), el cual es un medio rico en nutrientes que cumple todos los requisitos nutricionales para el crecimiento rápido de los microorganismos seleccionados. Este medio de cultivo ofrece diversas fuentes de aminoácidos esenciales para el crecimiento bacteriano, aporta vitaminas, sales y minerales necesarios para el equilibrio osmótico [15].

Las especies bacterianas se obtuvieron del consorcio de microorganismos del proyecto, aisladas en una etapa más temprana del mismo y conservadas a -20°C en suspensión de glicerol dentro de los laboratorios del parque técnológico de ITESO. Las especies utilizadas se identificaron con un número de referencia: *Bacillus megaterium* (10), *Bacillus vallismortis* (11), *Bacillus subtilis* (12), *Bacillus pumilus* (20), y *Pectobacterium betavasculorum* (24).

Con el propósito de activar las bacterias, se tomaron 500 µL de la suspensión de cada una de las diferentes cepas contenidas en los viales preservados, y se resuspendieron en 5 mL de medio LB estéril dentro de tubos Cónicos, correspondiendo a una relación de 1:10 en volumen para cada caso, conteniéndolas dentro de un orbital a 37°C y una agitación de 150 rpm. Se continuó con su activación siguiendo la misma relación, pero incrementando el volumen total del cultivo líquido en un proceso de tres etapas separadas cada una por un plazo de 24 horas hasta contar con 100 mL, de los cuales 98 mL se destinaron para el proceso de encapsulado, y 2 mL para la caracterización del género y la viabilidad celular *in vitro*. El volumen total de cultivo de las distintas cepas fue distribuido en distintos tubos cónicos de 50 mL con el propósito de acortar el tiempo de las cinéticas de crecimiento (figura 2).



Figura 2. Cultivo líquido de propagación de las diferentes cepas bacterianas a volúmenes de 20 mL totales por tubo cónicos.

Con el fin de corroborar la presencia exclusiva de las especies bacterianas, se optó por realizar una tinción gram que permitó su correcta identificación. Se observó morfología de la colonia dentro de los cultivos generados transcurrido el tiempo de incubación (figura 3), y se tomó una muestra de aproximadamente medio cm^2 para su evaluación, resuspendiéndola en condiciones de esterilidad en una gota de agua destilada sobre un portaobjetos.

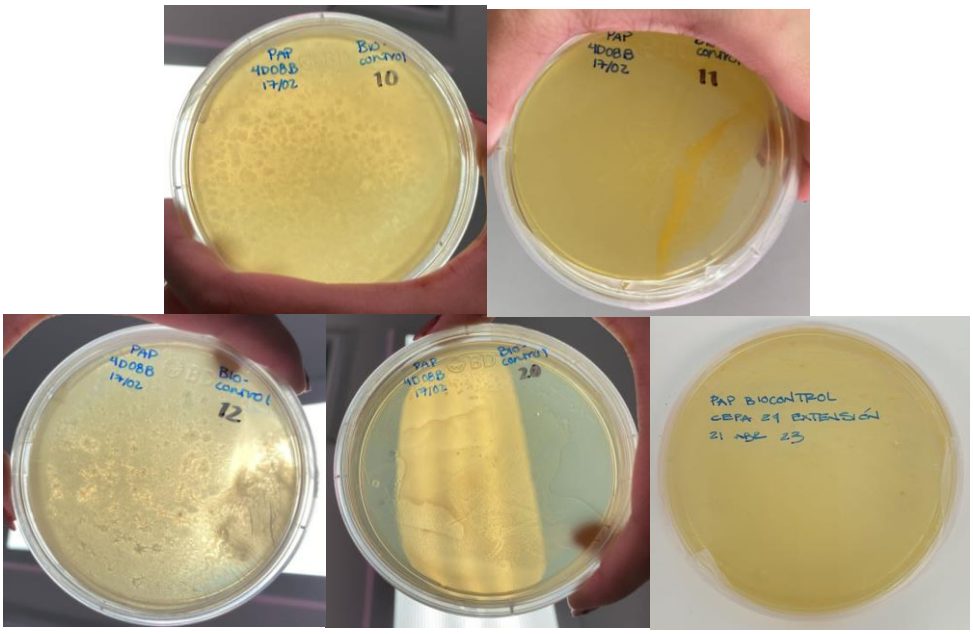


Figura 3. Cultivos sólidos por técnica de extensión en placa de las cinco diferentes cepas bacterianas.

Una vez extendida la muestra se fijó con calor, realizando movimientos circulares por encima de la llama del mechero. Se realizó una tinción Gram en la muestra para visualizar los microorganismos al microscopio. Se aplicó sobre las bacterias fijadas cristal violeta por un minuto, se lavaron con el frasco lavador y agua destilada; se añadió Lugol durante un minuto, se volvió a lavar; posteriormente se añadió durante 10 a 15 segundos la mezcla de alcohol; se lavó y se añadió la safranina durante un minuto; y finalmente se lavó con agua destilada, dejando secar la muestra al aire para observar en microscopio (figura 4).

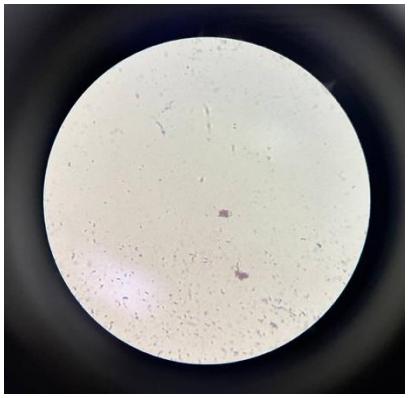


Figura 4. Observación bajo el microscopio de las tinciones generadas durante la corroboración de género y morfología; bacteria gram- *Pectobacterium betavasculorum*.

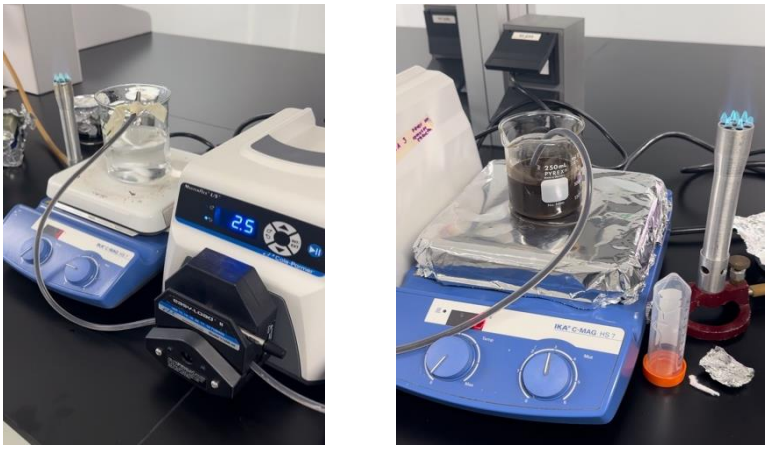
Encapsulamiento de las cepas

La microencapsulación es una técnica de empaquetamiento de sustancias químicas y agentes biológicos, que está conformada por partículas con una membrana polimérica. La encapsulación de microorganismos permite el aislamiento físico y proporciona protección contra factores del medio ambiente o físico-químicos del suelo, permitiendo la liberación del agente encapsulado. El alginato es utilizado como agente encapsulante, debido a que es un polímero natural y a sus características biodegradables, a su liberación lenta de agentes encapsulados y su bajo costo [3].

Durante el planteamiento del protocolo del presente PAP se propuso el seguimiento de la formulación utilizada durante la etapa previa del proyecto, utilizando el alginato de sodio como matriz base de encapsulamiento para los microorganismos. En esta nueva etapa del proyecto, se formuló una matriz complementaria tomando en cuenta diferentes aditivos, como el almidón soluble procedente de tejidos vegetales, y ácidos húmicos. Con base en trabajos anteriores del proyecto, se optó por la concentración de alginato de sodio de 2% del volumen total para el mantenimiento de las especies *Bacillus*. La relación para el almidón soluble se determinó tras realizar pruebas de encapsulamiento a diferentes proporciones: 2%, 5%, y 8%; las cápsulas con un porcentaje de almidón soluble al 5% proporcionaba la resistencia suficiente a las cápsulas. Estos dos últimos parámetros, alginato de sodio y almidón soluble, se basaron en una relación p/v. Finalmente, el ácido húmico se planteó para representar al 1% v/v de la disolución final de un producto base concentrado al 10%. Para el encapsulamiento, se consideró un volumen final de 2 litros. Se encapsularon 1200 mL con un consorcio de las bacterias, donde el concentrado de biomasa representó el 1% del volumen final de la mezcla; el volumen restante de la matriz fue encapsulada sin consorcio de microorganismos.

Las bacterias activadas se extrajeron en fase exponencial mediante centrifugación a 3000 rpm dentro de tubos cónicos de 50 mL. Se consideró esta fase una vez que la absorbancia del medio de propagación se encontró dentro de los 0.8 a 1.0. Se decantó la mayoría del volumen del medio y se resuspendió cuando se contaba con el volumen necesario. El concentrado bacteriano se vertió dentro de la mezcla matriz correspondiente.

Las mezclas formadas por los aditivos y los microorganismos se extruyeron desde puntas estériles para micropipeta de 1000 µL hacia una solución de cloruro de calcio ($CaCl_2$) al 1 M con ayuda de una bomba peristáltica (figura 5), permitiendo el goteo de la disolución de alginato de sodio con aditivos hacia el volumen de la disolución, la cual se encontró en constante agitación (figura 5a).



a) **b)**

Figura 5. Sistema de bombeo utilizado durante la experimentación. a) disolución de cloruro de calcio ($CaCl_2$) al 1 M en constante agitación; b) apartado de la mezcla de matriz final con microorganismos.

Una vez se obtuvieron las cápsulas, estas se recuperaron bajo ambiente estéril y se conservaron dentro de una disolución de agua salina 0.9 M hasta su posterior uso (figura 6).



a) **b)** **c)**

Figura 6. Proceso de formación y recuperación de las cápsulas formadas. a) Disolución de cloruro de calcio ($CaCl_2$) al 1 M en constante agitación con cápsulas de la mezcla final; b) recuperación de cápsulas tras filtración de la disolución de $CaCl_2$; c) suspensión de las cápsulas obtenidas en una disolución de agua salina 0.9 M.

Viabilidad celular, prueba in vitro

La viabilidad celular es la proporción de células vivas y funcionales existentes en una población celular [16], se utiliza para determinar la viabilidad, pureza y preservar el depósito microbiano en el tiempo. La vitalidad celular también se refiere a la capacidad de los microorganismos para multiplicarse y crecer en medios de cultivo bajo condiciones de laboratorio [17].

La viabilidad de las células microbianas se evalúa rutinariamente en una colección de cultivo después del proceso de preservación, en este caso, de encapsulamiento. Para ello, se determina la vitalidad de las colonias en medios de cultivo específicos. Para la evaluación de la viabilidad primero se debe regenerar la muestra para posteriormente realizar diluciones seriadas e inocular en un medio de cultivo específico, y finalmente evaluar el crecimiento y su pureza. El fundamento de este proceso es determinar de forma sencilla la eficiencia del crecimiento de microorganismos, siendo esto medido en Unidades Formadoras de Colonias por mL (UFC/mL) [17].

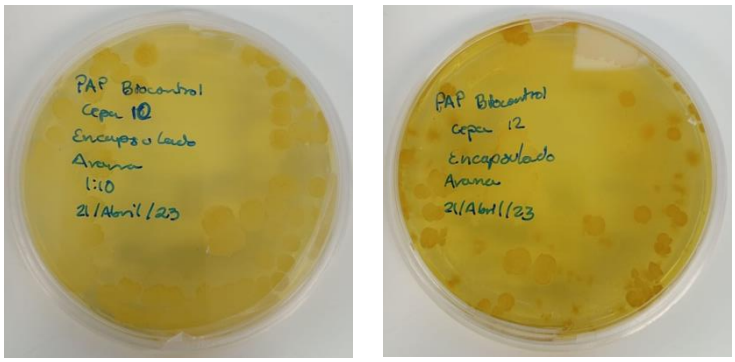
Se determinó la viabilidad de las cuatro cepas de bacterias del género *Bacillus* evaluando el crecimiento en medios nutritivos tras obtener un inóculo proveniente de cápsulas formadas. Para ello, se tomó un gramo de cápsulas formadas de la mezcla final y se sometieron a agitación constante durante 10 minutos dentro de una disolución de tri-citrato de sodio 0.4 M a una relación de 1:10 p/v, para lograr desintegrar las cápsulas y liberar el contenido en su interior [18]. Una vez se contó con un inóculo proveniente de las cápsulas, se recuperó un militro y se cultivó por técnica de estriado en una caja Petri con medio LB sólido, y se dejó en incubación a 37°C durante un período de 48 horas (figura 7).



Figura 7. Crecimiento del consorcio de microorganismos del género *Bacillus* proveniente de cápsulas tras tratamiento con tri-citrato de sodio e inoculado en una dilución 1:10.

Las cápsulas que contenían al consorcio de bacterias *Bacillus* presentaron un total de 890 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro, por un militro de inóculo diluido en una proporción 1:10, lo que nos da a entender que un gramo de cápsulas tiene el potencial de 890 de UFC/mL.

Este mismo procedimiento se repitió para cápsulas de alginato con *B. subtilis* y *B. megaterium* obtenidas en una etapa previa del presente PAP, con el fin de analizar su viabilidad 4 meses después de su formación y contención a temperatura ambiente en disolución de agua salina 0.9 M (figura 8).



a) **b)**

Figura 8. Crecimiento de microorganismos del género *Bacillus* proveniente de cápsulas tras 4 meses desde su formación después de tratarlas con tri-citrato de sodio e inoculado en una dilución 1:10; a) crecimiento de *B. megaterium* encapsulado en perlas de alginato; b) crecimiento de *B. subtilis* encapsulado en perlas de alginato

El inóculo en una proporción de 1:10, las cápsulas del microorganismo *B. megaterium* presentaron un crecimiento de 66 UFC/mL, este resultado sugiere que un gramo de cápsulas diluido en 10 mL de tri-citrato de sodio 0.4 M tiene un potencial de 660 UFC/mL. De manera similar, el cultivo del microorganismo *B. subtilis* sugiere un potencial de 490 UFC/mL por cada gramo de cápsulas.

Análisis del potencial de control biológico de las cepas subtilis y vallismortis del género Bacillus respecto al fitopatógeno Pectobacterum betavasculorum.

El análisis de controladores biológicos debe llevar implícita la evaluación de un agente específico para el control de un patógeno. La mejor predicción de éxito para un programa de control biológico es la evidencia de su éxito en situaciones similares. El análisis implica comparar los agentes potenciales de control biológico o los agentes que han tenido éxito

diferencial en la práctica. El análisis considera factores como la capacidad del agente para colonizar el huésped, su capacidad para competir con el patógeno por nutrientes y espacio, y su capacidad para producir toxinas o enzimas que son tóxicas para el patógeno [19]. De igual manera, se considera la capacidad del agente para tolerar las condiciones ambientales y su impacto potencial en organismos que no son el objetivo [20].

El método de confrontación entre un microorganismo de control biológico y un fitopatógeno *in vitro* es una técnica para estudiar cómo el primero puede inhibir el crecimiento del segundo. Se cultivan ambos organismos en placas de agar y se miden parámetros como su tasa de crecimiento y el tamaño de la zona de inhibición alrededor del microorganismo de control biológico. Los resultados de estos experimentos pueden proporcionar información importante sobre los mecanismos mediante los cuales el microorganismo de control biológico puede suprimir el crecimiento del fitopatógeno.

Para los enfrentamientos de los microorganismos de control biológico con el fitopatógeno se realizaron diferentes pruebas con los siguientes tratamientos: inóculo de *B. subtilis* e inóculo proveneniente de cápsulas de consorcio microbiano. Se cultivaron por triplicado cajas Petri con medio sólido LB inoculadas por extensión con el fitopatógeno *P. betavasculorum*. Después se inocularon círculos de papel filtro estériles de 10 mm de diámetro con 500 µL de *B subitilis* a una concentración de 490 UFC/mL o con el consorcio microbiano a una concentración de 890 UFC/mL (figura 9).

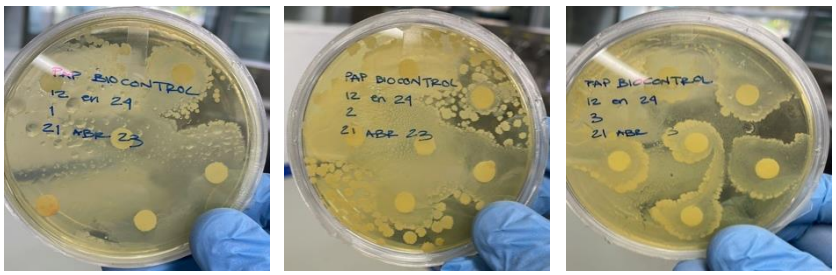


Figura 9. Cultivo de enfrentamiento entre las especies bacterianas *B. subtilis* en cultivo por extensión de *P. betavasculorum.*

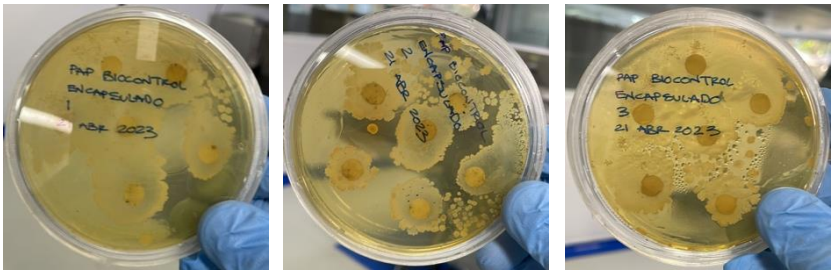


Figura 10. Cultivo de enfrentamiento entre las especies bacterianas del consorcio de *Bacillus* en cultivo por extensión de *P. betavasculorum.*

Se observó de forma comparativa la actividad inhibidora entre el *B. subtilis* con respecto a la del consorcio. Si bien, ya se encuentra bastante estudiada la actividad de control biológico de *B. subtilis* [5], no se tiene registro sobre su comportamiento en presencia de otras especies de su mismo género. En la figura 10 se observa que no se presentó crecimiento de *Pectobacterum betavasculorum* en presencia de cualquiera de los tratamientos, lo que indica que el género *Bacillus* tiene una fuerte inhibición de crecimiento sobre el fitopatógeno. Se tomó como placa control al cultivo sólido en caja Petri que se observa en la figura 11, clasificada con su número de identificación (24).

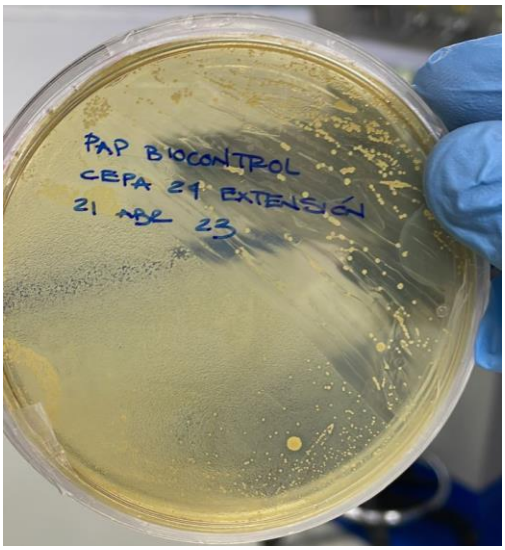


Figura 11. Cultivo por extensión de *P. betavasculorum.*

Análisis de la estructura del encapsulado

La microscopía electrónica va más allá del límite de resolución de un microscopio óptico, y se fundamenta en el uso de un haz de electrones acelerados en el vacío que, además de recorrer trayectorias rectas, se comportan como una onda similar a la luz visible. La fuente

de radiación del microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés Scanning Electron Microscope) es un haz de electrones acelerados por un alto potencial eléctrico (25,000 Voltios). El SEM permite obtervar resoluciones de 4 nanómetros con magnificaciones de hasta 300.000x, de esta manera permite obtener imágenes de materiales estructurales y biológicos [21], como lo propuesto en este proyecto, el cual es el encapsulado y los microorganismos, es decir, un material estructural y uno biológico. El equipo utilizado se muestra en la figura 12.



Figura 12. Microscopio Electrónico de Barrido

Las imágenes del microscopio electrónico se obtienen mediante la detección, procesamiento y visualización de las señales resultantes de las interacciones entre un haz de electrones de acelerados con la materia. Estas interacciones pueden proporcionar información sobre topografía, composición y estructura cristológráfica. El SEM se constituye por un cañón electrónico en una columna de alto vacío, del orden de 10 -5 mm de Hg, en la cual se genera un haz de electrones de alta energía (5-30 kV). El haz se concentra por una serie de lentes electrónicas y focalizados sobre la muestra analizada. Los detectores registran las señales

originadas por la interacción entre el haz de electrones y la muestra, que son procesadas y visualizadas en el sistema final de observación (pantalla de computadora) [22].

Las muestras de encapsulados se prepararon antes de enviarse al SEM. Las cápsulas se colocaron en una caja Petri para su deshidratación, mediante un gradiente de deshidratación usando soluciones de 30%, 50%, 70%, 80%, 90% y 100% de etanol por 10 minutos para cada concentración. Posteriormente se llevaron las muestas al laboratorio de nanotecnología del edificio J del ITESO, en el cual se observó y se descargaron las imágenes de la estructura del material y microorganismos encapsulados.

Las imágenes tomadas con el SEM nos permitieron observar los encapsulados sin microorganismos. La figura 13 muestra la estructura de la cápsula que, aunque deshidratada, hace suponer una estructura esférica. Se utilizó la escala de la parte inferior de la figura 13 para calcular el volumen externo e interno del encapsulado, mismo que se explica más adelante. En la figura 14 se puede observar un encapsulado con el corte transversal, de igual forma con la escala mostrada en la parte inferior derecha nos permitió determinar el grosor del encapsulado. Con los datos de diámetro y grosor de encapsulado se determinó el volumen exterior e interior del encapsulado.

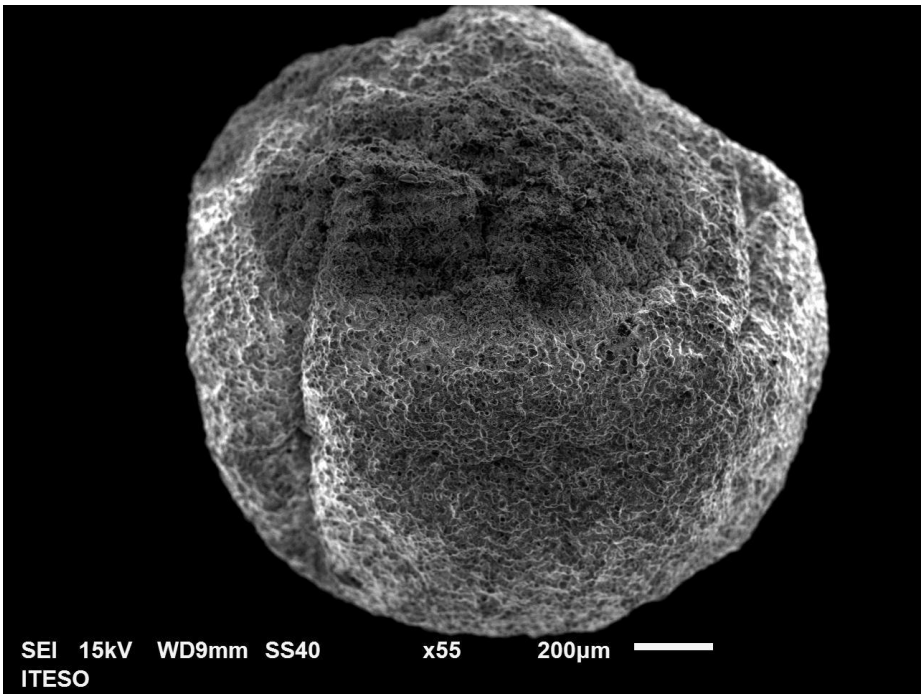


Figura 13. Microfotografía del encapsulado. Se observa la deformación causada por deshidratación.

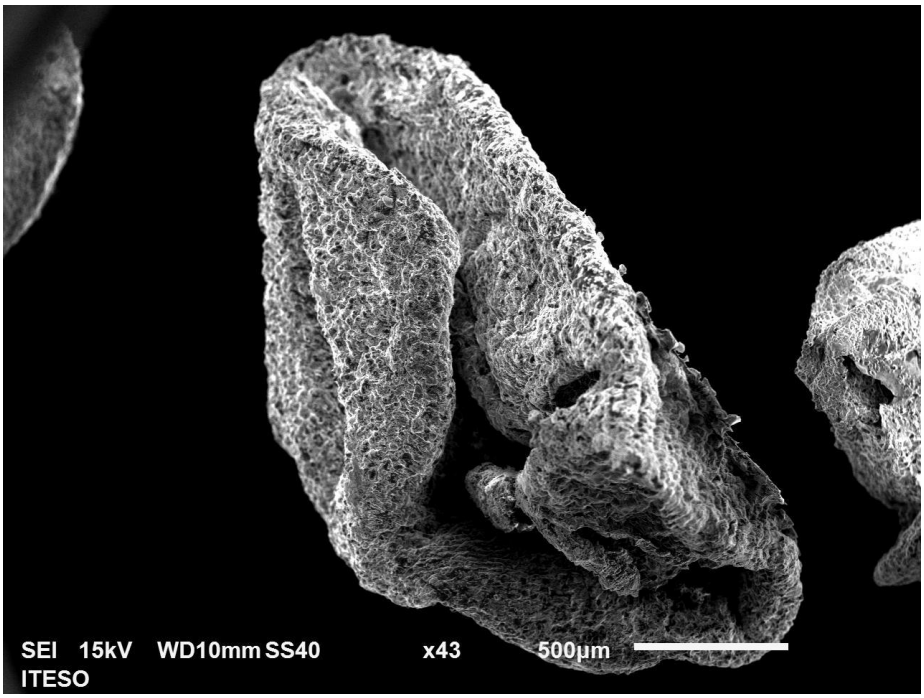


Figura 14. Microfotografía de la cápsula con corte transversal, el proceso de deshidratado hizo que se deformara.

Las figuras 13 y 14 contribuyeron al cálculo del volumen del encapsulado. Se estableció que el diámetro de las cápsulas es de 1,5045.45 µm, es decir, 0.1545 cm y se determinó que su

grosos es de 125 µm. Con estos valores, se utilizó la ecuación 1 para calcular los volúmenes internos y externos de la cápsula:

$$V = \frac{4}{3}\pi r^3$$ **Ecuación 1**

Donde:

V es el volumen de la cápsula

r es el radio de la cápsula

π es el número pi

Utilizando la ecuación 1 se procedió a calcular el volumen externo de la cápsula, utilizando la mitad del diámetro total para obtener el valor del radio. Asimismo, se calculó el volumen interno utilizando el mismo valor del radio, pero restando el grosor de la cápsula. Como resultado, se obtuvieron los volúmenes de 0.01544 cm^3 y 0.01199 cm^3 para el volumen externo e interno, respectivamente.

Las figuras 15 y 16 mostraron la estructura superficial de los encapsulados, revelando presencia de figuras cristalinas o piramidales en la superficie. Para determinar la composición química, se llevó a cabo un análisis mediante espectroscopia de rayos X de energía dispersa (EDS, Energy Dispersive Spectroscopy), cuyos resultados se representan en las figuras 17 y 18.

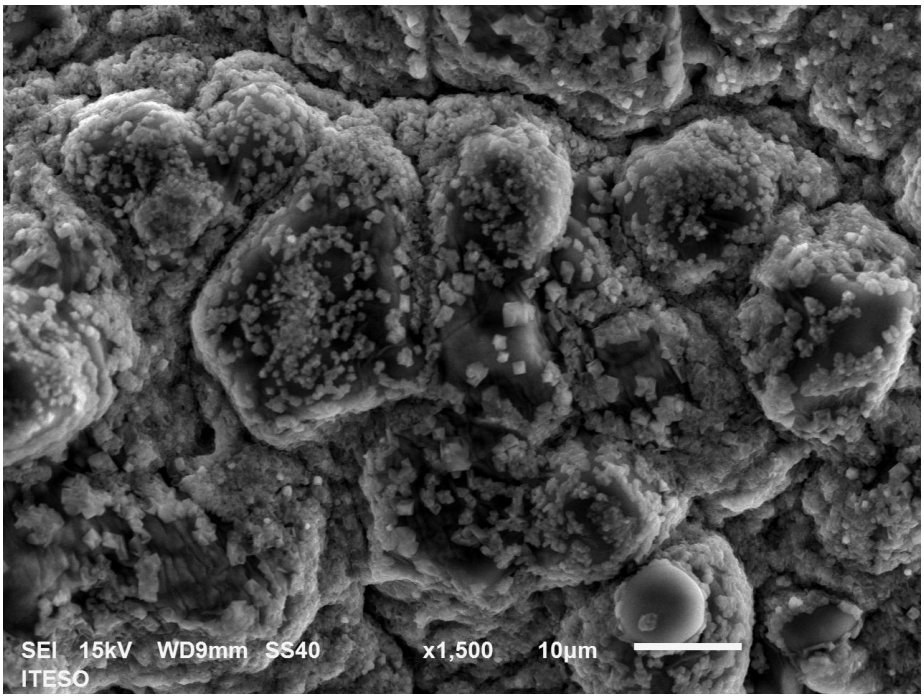


Figura 15. Microfotografía de la estructura superficial de la cápsula

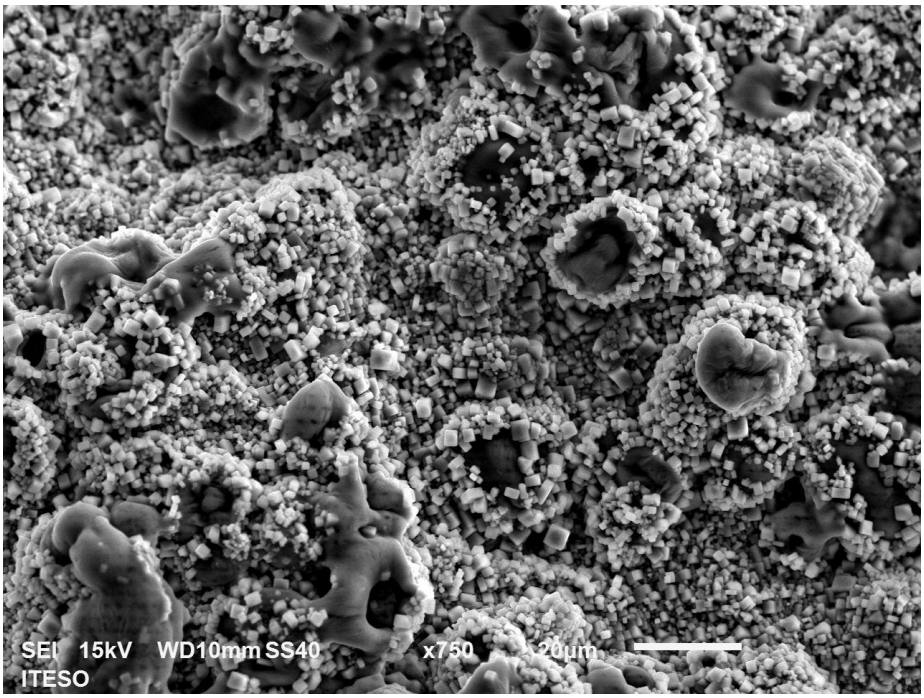
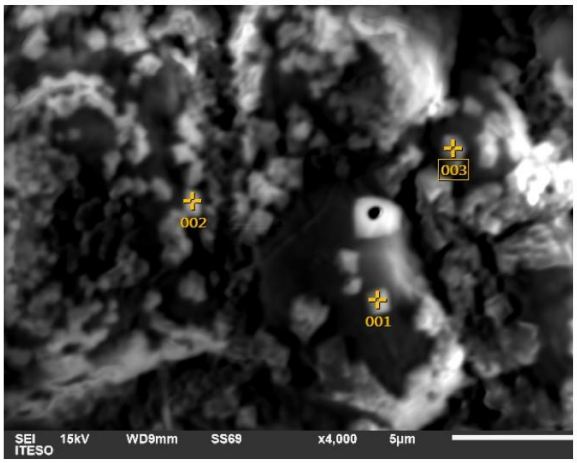


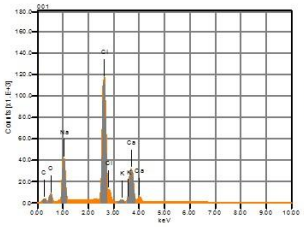
Figura 16. Microfotografía de la estructura superficial de la cápsula con estructuras cristalinas ancladas.

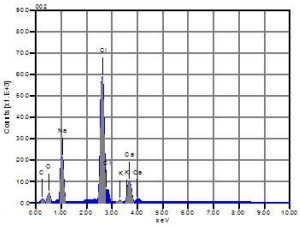
Las figuras 17 y 18 muestran la composición química de la superficie del encapsulado con una composición principal de cloro y carbono, 39.19 y 20.56%, respectivamente, lo cual representa el 59.75% de los elementos químicos presentes en el encapsulado. De igual forma, la figura17 muestra la ubicación de los elementos en la superficie del encapsulado.

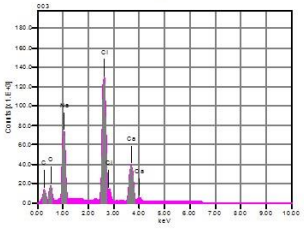
003



Volt : 15.00 kV
Mag. : x 4,000
Date : 2023/04/26
Pixel : 1280 x 960







Acquisition Condition
Instrument : 6010LA
Volt : 15.00 kV
Current : ---
Process Time : T2
Live time : 60.00 sec.
Real Time : 86.15 sec.
DeadTime : 30.00 %
Count Rate : 70773.00 CPS

	K	O	C	Na	Cl	Ca	
001	0.47	9.87	16.89	10.74	41.33	20.69	
002	0.58	10.61	17.07	12.07	45.74	13.94	
003		13.29	27.71	12.52	30.51	15.98	
Average	0.52	11.26	20.56	11.78	39.19	16.87	
Standard deviation		0.04	1.17	4.13	0.43	5.02	0.51

JEOL EDS System JEOL

Figura 17. Análisis mediante espectroscopia de rayos X de energía dispersa en 3 puntos de las estructuras cristalinas encontradas.

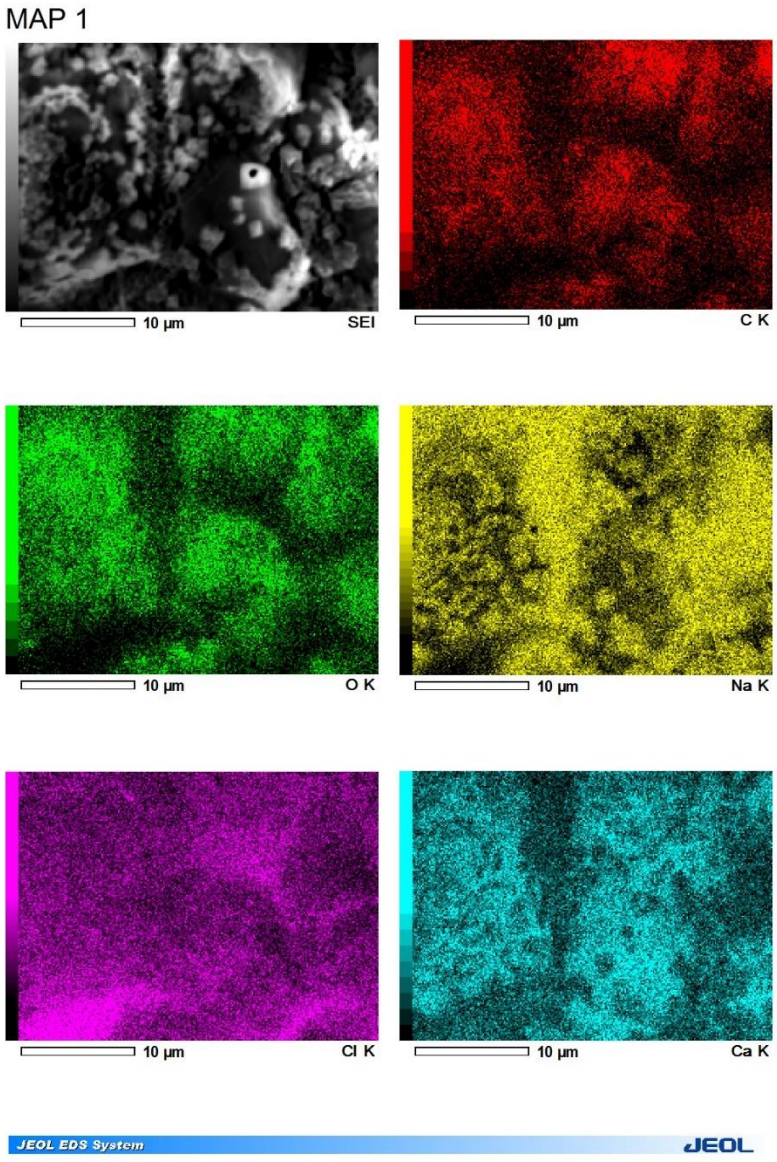


Figura 18. Mapa de los diferentes compuestos químicos encontrados en la estructura superficial del encapsulado.

1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

El presente proyecto ofrece una alternativa a la aplicación de fertilizanres químicos y pesticidas en la agricultura, mediante el uso de bacterias del género *Bacillus* encapsuladas cuyo propósito es promover el crecimiento vegetal y controlar biologicamentre los fitopatógenos.

Se logró formular encapsulados, tomando en cuenta las formulaciones de anteriores PAPs. En el presente proyecto, se adicionó almidón soluble para tener una mayor estabilidad en la estructura de la membrana de los encapsulados; también se agregaron ácidos húmicos que permitieran el aumento de la vitalidad de dichas cepas y fungiera, además, como estimulador de crecimiento en las plantas. Esto quedó demostrado empíricamente al observar las cápsulas mediante el microscopio electrónico de barrido. En el análisis de la estructura, como se mencionó previamente, se obtuvieron los volúmenes externos e internos de la cápsula: 0.01544 cm^3 y 0.01199 cm^3, respectivamente. El mantenimiento de la viabilidad se demostró mediante el cultivo del consorcio de bacterias encapsuladas, donde se obtuvo un potencial de 890 de UFC/mL.

Se realizó un análisis químico mediante EDS, como se observa en las figuras 16 y 17, mostrando que el principal elemento que se encuentra en la superficie del encapsulado es el cloro, esto debido a la matriz utilizada para encapsular, es decir el cloruro de calcio. Esto puede describir la composición química de la figura 15 y hace suponer que las estructuras cristalinas son sales de cloruro de calcio ancladas al alginato de la estructura del encapsulado. Es posible que la reacción entre el cloruro de calcio y el alginato de sodio forma alginato de calcio, que es la estructura del encapsulado, y que los iones de cloro y sodio reaccionan entre sí para formar cloruro de sodio y quedarse anclados a la estructura del encapsulado. Finalmente, lo que se observó en el SEM ayuda a entender que la estabilidad del encapsulado es alta, pues muestra consistencia en la estructura, aunado a que no hubo rompimientos debido a la deshidratación. Se le puede dar más profundidad al tema de la estabilidad con futuras pruebas de vida de anaquel y pruebas de estabilidad.

Además, mediante el análisis del potencial de control biológico de las cepas, se determinó una fuerte inhibición del fitopatógeno *Pectobacterium betavasculorum* por parte de las

bacterias encapsuladas, parecido al efecto inhibitorio que se presentó por parte de la cepa *B. subtilis* proveniente de un cultivo líquido. Esta capacidad de control biológico se atribuye a la producción de compuestos antibacterianos de las cepas encapsuladas, tales como enzimas hidrolíticas y sustancias antagonistas que reducen la población de patógenos y previene su crecimiento [23]. Estos microorganismos biocontroladores pueden producir una amplia gama de compuestos que son tóxicos para los patógenos. Dichos compuestos inhiben el crecimiento de los patógenos al alterar sus paredes celualres, membranas o vías metabólicas [24]. La inhibición del patógeno representa un logro significativo, ya que *P. betavasculorum* puede provocar la necrosis vascular bacteriana y la pudrición de raíces [25]. Por lo tanto, la capacidad demostrada por las cepas bacterianas encapsuladas en este proyecto de controlar eficazmente a *P. betavasculorum*, sugiere que estas cepas pueden tener un gran potencial como agentes de control biológico contra este fitopatógeno y posiblemente otros similares. Además, los resultados obtenidos a partir del análisis del potencial de control biológico también proporcionan una base sólida para una futura investigación y desarrollo de soluciones biológicas que puedan ser utilizadas en la agricultura sostenible.

Durante el desarrollo del proyecto, se identificaron algunas perspectivas y puntos pendientes que merecen ser mencionados. En primer lugar, se destaca la necesidad de realizar pruebas de los encapsulados en plantas, para determinar su capacidad como controladores biológicos. Aunque se logró demostrar su actividad inhibidora sobre el fitopatógeno *Pectobacterium betavasculorum*, es importante evaluar su eficacia en cultivos *in vivo*. Por lo tanto, se propone continuar con la investigación y llevar a cabo pruebas en plantas, para determinar la capacidad de los encapsulados.

Además, se reconoce la importancia de realizar pruebas de vida de anaquel más prolongadas para determinar la durabilidad de los encapsulados a lo largo del tiempo bajo condiciones controladas. Si bien se realizaron pruebas iniciales para determinar la viabilidad de las cepas bacterianas y se obtuvieron resultados prometedores, es fundamental realizar pruebas a largo plazo para evaluar la estabilidad de los encapsulados. De esta manera, se podría determinar la capacidad de los encapsulado para mantener su actividad biológica y su capacidad de control biológico, lo que permitiría establecer un periodo de validez.

A pesar de dichas perspectivas, el proyecto logró importantes avances en el desarrollo de la matriz para el encapsulamiento. Se logró formular esta nueva matriz liquida, distinta a las formuladas a lo largo del proyecto, que permitió encapsular el consorcio de cuatro especies bacterianas, que, de esta manera, permitió la obtención de encapsulas con viabilidad comprobada.

1.7. Bibliografía y otros recursos

[1] I. Corona Ramírez. El desarrollo de la agricultura y el impacto que tendría en las finanzas públicas de México. 2016

[2] Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. México potencia en control biológico de plagas. 2019.

[3] J. L. Hernández Mendoza, P- L- Hinojosa López, Á. Salazar Bravo, J. G. García Olivares, G. C. Rodríguez Castillejos & J. D. C. Quiroz Velásquez. Conservación por microencapsulación de bacterias de uso agrícola: *Azospirillum brasilense*. Revista Boliviana de Química. 2018;35(4):117-122.

[4] M. F. Villareal-Delgado, E. D. Villa-Rodríguez, L. A., Cira-Chávez, M. I., Estrada-Alvarado, F. I. Parra-Cota & S. de los Santos-Villalobos. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. Revista mexicana de fitopatología. 2018; 36(1): 95-130.

[5] A. T. Kovács. *Bacillus subtilis*. Microbe of the month. 2019; 27(8):724-725.

[6] A. Calderón Villegas. Aislamiento, caracterización e identificación de compuestos naturales en *Bacillus megaterium*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2022.

[7] M. Cruz-Martín, E. Mena, C. Sánchez-García, B. Roque, M. Acosta-Suárez, T. Pichardo, M. Leiva-Mora & Y. Alvarado-Capó. The effects of plant growth promoting *Bacillus pumilis* CCIBP-C5 on ‘Grande naine’ (*Musa* AAA) plants in acclimatization stage. Biotecnología Vegetal. 2015; 15(3):151-156.

[8] D. Cubero-Agüero, L. Brenes-Guillén, D. Vidaurre-Barahona & L. Uribe-Lorío. *Raoultella terrígena* y *Pectobacterium carotovorum* en hortalizas en dos provincias de Costa Rica. Agronomía Mesoamericana. 2021; 32(1): 178-195.

[9] M. Ozturk, Z. Eroglu & S. Soylu. First report of Pectobacterium betavasculorum associated with bacterial vascular necrosis and root rot disease of sugar beet in Turkey. New Disease Reports. 2019; 39;20.

[10] D. J. Mendoza Aguayo. Programa de investigación del DPTI. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente. 2020

[11] ONU. Efecto de plaguicidas y fertilizantes sobre el medio ambiente y la salud y formas de reducirlos. 2022

[12] E. Nava-Pérez, C. García-Gutiérrez, J. R., Camacho-Báez, E. L Vázquez-Montoya. Bioplaguicidad: una opción para el control biológico de plagas. 2012-

[13] E. Torres Sanchez, H, Cárdenaz Cota & M. de la Torre Martínez. Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. 2007.

[14] I. Meftah, N. El Mernissi, S. Eddine, M. El Mehdi, A. El Kacem & R. Bouhfid. Bioformulation of Microbial Fertilizer Base don Clay and Alginate Encapsulation. Current Microbiology. 2021; 78, 86-94.

[15] D. Fritze and D. Claus, “Chapter 4 Media for bacillus spp. and related genera relevant to foods,” Handbook of Culture Media for Food Microbiology, pp. 61–77, 2003, doi: https://doi.org/10.1016/s0079-6352(03)80007-3.

[16] E. M. López Álvarez. Métodos para determinar la viabilidad celular con aplicación en odontología. Universidad de San Martín de Porres. 2019.

[17] M. Guerra, J. F. Castro. Evaluación de viabilidad de microorganismos. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA. 139-153. 2020.

[18] G. S. Muchiutti, L. Hernan, F. A. Córsico, and V. J. Larrosa, “Cápsulas de alginato para la protección de polifenoles presentes en el aceite esencial de orégano,” Ciencia, docencia y tecnología, no. 59, pp. 297–309, 2019, Accessed: May 02, 2023. [Online]. Available: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-17162019000200012

[19]W. W. Murdoch y C. J. Briggs, "Theory for Biological Control: Recent Developments", Ecology, vol. 77, n.º 7, pp. 2001–2013, octubre de 1996. Accedido el 3 de mayo de 2023. [Online]. Available: https://doi.org/10.2307/2265696

[20] NUEVO: H. J. Kotula, G. Peralta, C. M. Frost, J. H. Todd y J. M. Tylianakis, "Predicting direct and indirect non-target impacts of biocontrol agents using machine-

learning approaches", PLOS ONE, vol. 16, n.º 6, junio de 2021, art. n.º e0252448. Accedido el 3 de mayo de 2023. [On line]. Available: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252448
[21] R. Soni and H. Keharia, “Phytostimulation and biocontrol potential of Gram-positive endospore-forming Bacilli,” Planta, vol. 254, no. 3, Aug. 2021, doi: https://doi.org/10.1007/s00425-021-03695-0.
[22] E. Sansinenea, “Bacillus spp.: As Plant Growth-Promoting Bacteria,” Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms, pp. 225–237, 2019, doi: https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3_11.
[23] R. Lahlali et al., "Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective", Microorganisms, vol. 10, n.º 3, p. 596, marzo de 2022. Accedido el 3 de mayo de 2023. [Online]. Available: https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596
[24] A. Reyes, G. Rincón, L. López, Z. Evangelista y E. Quiñones, "Lucha entre microbios: una herramienta para el control de enfermedades de plantas", Revista Digit. Universitaria, vol. 16, n.º 11, noviembre de 2015. Accedido el 2 de mayo de 2023. [Online]. Available: http://www.revista.unam.mx/vol.16/num11/art92/index.html
[25] M. Ozturk, Z. Eroglu y S. Soylu, "First report of Pectobacterium betavasculorum associated with bacterial vascular necrosis and root rot disease of sugar beet in Turkey", New Disease Rep., vol. 39, p. 20, junio de 2019. Accedido el 3 de mayo de 2023. [Online]. Available: https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.039.020

2. Productos

El producto da respuesta a los objetivos planteados en este proyecto, pues se logró el encapsulamiento de las bacterias de género *Bacillus* mediante la formulación del encapsulamiento. De igual forma, se vio una respuesta positiva a su actividad como agente de control biológico conta el fitopatógeno *Pectobacterium betavasculorum*.

La realización del producto se realizó con recursos del proyecto FAI, utilizando materiales y reactivos que se tenían en el almacén de los laboratorios de biotecnología del ITESO debidamente identificados. De igual forma, se tuvo asesoramiento por parte del Dr. Alejandro Arana para realizar las formulaciones, el encapsulamiento y los cultivos bacterianos.

Nombre y código del PAP	Programa de desarrollo tecnológico para la sustentabilidad ambiental, energética y alimentaria I PAP4D08B
Nombre del proyecto	Control biológico
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	El producto son encapsulados de cepas del género *Bacillus*, realizadas a base de alginato de sodio, almidón, ácido húmico y cloruro de calcio. Se realizó para el Departamento de Procesos Tecnológico Industriales del ITESO. La función de los encapsulados es realizar acciones de control biológico y, a la vez, de fertilizante natural (en respuesta a las restricciones del uso de pesticidas y fungicidas sintéticos).
Autores:	Juan Manuel Alejandro Flores Martínez, Scarlett Frausto Trigo, Marcelo Gallardo Rodríguez y Alejandro Arana Sánchez

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

Marcelo Gallardo

Este proyecto, que se realizó casi todo el tiempo en el laboratorio, puede tener implicaciones sociales, pues vemos en la identificación de la problemática que si estos productos que desarrollamos, no solo nosotros sino en semestres anteriores y en otros proyectos, se aplican para un bien mayor, es posible contribuir a disminuir las problemáticas sociales. Creo que

fue difícil poder identificar durante el proyecto las implicaciones sociales y culturales, pues la cotidianidad y el seguimiento de protocolos para la producción llegó a acaparar la atención del proyecto, sin embargo, se logró seguir teniendo presente a quién iba dirigido el proyecto. En mí, el poder contribuir a un bien mayor me da alegría, ánimos e inquietud por poder actuar. Creo que estos sentimientos van de la mano con mi formación ignaciana, que se hace las cosas, como diría San Ignacio de Loyola, con *magis*, la cual viene del latín "el más", sin embargo, no es dar más o ser mejor, sino hacer las cosas de la mejor manera posible y para el bien de algo más grande.

Dentro de las aportaciones éticas y sociales, el buscar una alternativa para los plaguicidas sintéticamente químicos es una gran aportación, pues buscamos reducir los problemas de salud y de medio ambiente que producen estos compuestos. La formulación del encapsulado se puede proponer para otras cepas con potencial como agentes de crecimiento vegetal y así tener un fertilizante amigable con el medio ambiente y con posible uso masivo para la reforestación de zonas afectadas por el cambio climático.

Scarlett Frausto

La necesidad de buscar alternativas y diseñar soluciones seguras, ecológicas y de bajo costo se ha vuelto prioritaria para contrarrestar los efectos negativos de los productos químicos en la agricultura. Es evidente que estas prácticas han generado consecuencias negativas a largo plazo, tanto para el medio ambiente como para la salud humana. La necesidad de buscar alternativas sostenibles y respetuosas con el entorno se vuelve apremiante. Los microorganismos biofertilizantes y controladores biológicos encapsulados representan una opción prometedora, ya que ofrecen beneficios agrícolas sin los efectos perjudiciales asociados a los químicos sintéticos.

Este proyecto me llevó a reconocer la importancia de la sensibilización y difusión de información sobre estas alternativas. Es necesario que los agricultores, las comunidades productoras y la sociedad en general comprendan los beneficios de utilizar microorganismos benéficos en la agricultura y cómo pueden contribuir a la sostenibilidad y la preservación del medio ambiente.

Además, es esencial apoyar la investigación y el desarrollo de tecnologías de encapsulación que permitan la aplicación efectiva de estos microorganismos. Esto implica la colaboración entre diferentes sectores y la inversión en investigación científica y desarrollo tecnológico.

En resumen, este proyecto me hizo reflexionar y valorar la importancia de encontrar soluciones sostenibles y respetuosas con el entorno en la agricultura. La sensibilización y el apoyo a alternativas como los microorganismos biofertilizantes y controladores biológicos encapsulados pueden marcar la diferencia en la salud de las comunidades agrícolas y el medio ambiente a largo plazo. Como sociedad, debemos comprometernos a adoptar prácticas agrícolas más responsables y a promover el uso de soluciones ecológicas en beneficio de todos.

Juan Manuel Alejandro Flores

Inicialmente, se planteó el seguimiento del proyecto sobre una de las realidades más duras del campo agrícola en México: el uso excesivo de productos sintéticamente químicos por décadas. Este suceso ha comenzado a causar estragos en las comunidades productoras, implicando riesgo en la salud de los humanos y el medio ambiente. Se nos hizo énfasis sobre la necesidad de buscar alternativas a estas prácticas y realizar diseños que permitieran un uso seguro, ecológico y de bajo costo, el cual tendría un impacto directo sobre productores regionales.

El rol que se realizó durante el proyecto tuvo que ver precisamente con esta última parte, el diseño de estrategias y/o productos amigables con el medio ambiente que funionen de forma similar a las técnicas actuales. Contar con la posibilidad de crear, probar y analizar estrategias de esta índole me permite sentirme parte del cambio por el cual se debería estar trabajando constantemente, la transición a las actividades ecológicamente conscientes. Pensar en el potencial social que la aplicación de mis conocimientos profesionales me permite dimensionar los alcances a los que se puede llegar, poner tu parte en una serie de cambios que permitirán accesibilidad en un futuro a la agricultura sostenible. El poder contar con oportunidades de este tipo me permitió reflexionar acerca de la dirección a la que pretendo

dirigir mi carrera profesional, creando una lista tangible de los valores y creencias que deben de guiar mi ética profesional, otorgándome un sentido de pertenencia y reflexión.

3.2 Aprendizajes logrados

Marcelo Gallardo

Los aprendizajes que logré en este PAP fueron el uso de equipos de laboratorio, como el SEM y montar el equipo para realizar el encapsulamiento, de igual forma, trabajar en equipo para poder proponer un protocolo. Proponer una metodología, investigando en proyectos anteriores y artículos relacionados con el proyecto, pasar de tener la idea de cómo hacerlo a plasmarlo por escrito y poder dividir el trabajo. Dentro de los aprendizajes sociales están aprender a trabajar con personalidades diferentes a las mías, con tiempos diferentes y con modos de ser diferentes, aprender a comunicar mejor las necesidad académicas y personales para poder lograr el proyecto. A lo largo del semestre se tuvieron retos, primero las dos primeras semanas el poder proponer qué hacer de manera individual y posteriormente hacer el equipo con el mismo fin, durante el semestre aprender a trabajar en un nuevo equipo, y finalmente trabajar para lograr sacar adelante el proyecto. En el ámbito profesional logré aprender cómo plantear y dar seguimiento a proyectos, de igual forma estar enfocado en más de un proyecto pues no es mi única materia, al igual que en el ámbito laboral, no será solo un proyecto, se les dará seguimiento a varios procesos.

Scarlett Frausto

En cuanto a las competencias disciplinares, adquirí conocimientos y habilidades técnicas en la formulación y diseño de matrices líquidas y sólidas destinadas al control biológico de agentes patógenos en la agricultura. Aprendí a trabajar con microorganismos agentes de control biológico y fertilizantes biológicos, explorando su potencial como alternativas a los fertilizantes químicos. Durante el proceso, también me familiaricé con las técnicas de evaluación y análisis de estas matrices, asegurando su conservación adecuada.

A nivel social, el trabajo en equipo fue fundamental. Desde el inicio del proyecto, se fomentó la interacción y colaboración entre los miembros del equipo de Proyecto de Aplicación

Profesional (PAP), así como con nuestros asesores. También tuvimos la oportunidad de intercambiar información y experiencias con otros equipos que estaban trabajando en proyectos similares. Esta interacción social enriqueció nuestro aprendizaje y nos permitió ampliar nuestras perspectivas.

El proyecto me brindó la oportunidad de aplicar los conocimientos teóricos adquiridos durante mi formación académica en una situación práctica y real. Pude poner en práctica habilidades de investigación, análisis de datos, resolución de problemas y toma de decisiones. Esto fortaleció mi capacidad de enfrentar desafíos y encontrar soluciones efectivas.

Durante el desarrollo del proyecto, el momento más desafiante fue la etapa de diseño. Nos enfrentamos a la limitación de reactivos disponibles para evaluar alternativas y esto nos obligó a buscar oportunidades de manera más extensiva. Sin embargo, una vez que comenzamos a observar los resultados obtenidos después de la experimentación, sentí una satisfacción al darme cuenta de que el diseño era viable. Este proceso me enseñó a perseverar frente a los desafíos y a buscar soluciones creativas.

Juan Manuel Alejandro Flores

A lo largo del proyecto, desarrollé habilidades relacionadas a la estructuración, formulación y formación de diseño de matrices líquidas tanto sólidas destinadas para el aprovechamiento de propiedades de agentes biológicos, enfocadas principalmente en el control biológico de agentes patógenos para la agricultura. No obstante, se dio seguimiento a las técnicas de evaluación y análisis del propósito de dichas matrices, lo que culminó con su conservación oportuna. Se fomentó en todo momento la interacción entre los integrantes del equipo PAP, nuestros asesores e inclusive el intercambio de información con equipos diferentes que trabajaban con técnicas similares.

Si se tuviera que señalar el desafío más grande para esta etapa del proyecto, definitivamente tendría que ser sobre la etapa de diseño ya que se contaba con reactivos limitados a la hora de evaluar alternativas del proyecto, por lo que me obligó a una búsqueda más extensiva de oportunidades. Sin embargo, una vez se comenzaron a observar los resultados obtenidos tras

la experimentación, esto permitió obtener cierto nivel de satisfacción al analizar que el diseño era viable.

La aplicación de habilidades técnicas de mi profesión a problemáticas reales y tangibles me otorgó un sentido de pertenencia y oportunidad, facilitándome enfocar los esfuerzos hacia puntos de interés que podrían ser resueltos con aplicaciones propias, ofreciendo una gratitud personal y social con el grupo afectado.

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

Marcelo

	Competencia		**Evidencia**	**Relevancia /Fortaleza***	**Competencias nuevas**	**Competencias Potencializadas**
Categoriza las competencias en conocimientos, habilidades y actitudes. Escribe la o las evidencias de cada competencia y su relevancia.	**Conocimientos**	Ingeniería genética	Clase de ingeniería Genética y Regulación	Poder dirigir las mutaciones de un organismo para obtener las características esperadas	Elaboré el protocolo para la metodología y fundamentación del proyecto (en conjunto con mis compañeros). Formulé y realicé encapsulados de microorganismos. Desarrollar propuestas a base de un problema sin	Mejoraron mis buenas prácticas de laboratorio, como utilizar siempre la bata limpia, el lavado constante de manos y uso de guantes. Mejoré mi forma de trabajar en equipo y la forma de organizar las tareas. Mejoró mi entendimiento de los procesos
		Química General/Orgánica/Analítica	Clases de Química básica y semestre de becario en laboratorio de química	Poder conocer los compuestos, los materiales que se utilizan en el laboratorio y sus usos		
		Biología Vegetal	Clase de cultivo de células y	Entender el desarrollo de vegetal y		

			tejidos vegetales	poder analizarlo	una fórmula o pasos a seguir previos. Aprendí que se pueden hacer modificaciones sobre la marcha en los proyectos, sobre todo los de investigación debido a la naturaleza de estos. Desarrollé la paciencia y la adaptabilidad en equipo.	de crecimiento bacteriano y su interacción entre ellos. Mejoré mi organización mental, mediante el uso de algoritmos mentales para poder establecer el trabajo diario en el laboratorio.
		Programación informática	Clase de algoritmos y programación y algoritmos de solución numérica	Poder desarrollar una solución automatizada para encontrar soluciones numéricas o gráficas a los problemas de la ingeniería		
		Diseño de experimentos	Clase de diseño de experimentos	Poder desarrollar estrategias para poder conocer los factores que más influyen en la resolución de los problemas y poder tomar decisiones		
	Habilidades	Programar en Matlab	Uso en algoritmos de solución numérica, cinética química y biológica e ingeniería de biorreactores	Poder proponer soluciones a través de algoritmos matemáticos a los problemas de la ingeniería		

		Paquetería Microsoft Office	Certificación en Word y Excel	Redacción de reportes en Word; poder calendarizar o llevar un orden de los procesos en Excel		
		Análisis de datos	Exámenes, problemas de clase y proyectos a lo largo de la carrera	Poder tener claridad de qué significan los datos, poder tomar decisiones en base al comportamiento numéricos		
	Actitudes	Honesto	Becario de laboratorio de Química ITESO	Poder generar confianza entre los compañeros		
		Trabajo en equipo	Proyectos, prácticas de laboratorio y tareas colaborativas	Saber trabajar con cualquier tipo de personalidad, poder dialogar y llegar a soluciones para trabajar de la manera más eficaz		

		Trabajo individual	Exámenes y tareas individuales	Poder autogestionarse para lograr el objetivo de manera individual, también saber cuándo es necesario hacer consultas externas.		
		Organizado	Trabajo en ITESO, becario laboratorio de Química	Poder organizar mi cabeza y así poder organizar a mi alrededor, pero también saber ser flexible en la organización para cualquier contratiempo que afecte la organización		
		Comprometido	Equipo de atletismo de ITESO	Saber que, una vez contraído un compromiso, se debe de cumplir.		

La competencia más importante que desarrollé en este proyecto fue poder ser lo suficientemente flexible y lo necesariamente rígido en la planeación del proyecto, para poder hacer modificaciones y desarrollar estrategias para lograr el proyecto.

Scarlett

	Competencia		Evidencia	Relevancia /Fortaleza*	Competencias nuevas	Competencias Potencializadas
Categoriza las competencias en conocimientos, habilidades y actitudes. Escribe la o las evidencias de cada competencia y su relevancia.	**Conocimientos**	Medición de cinética de crecimiento de M.O.	Proyecto en cinética	Utilidad a nivel para el control de procesos fermentativo	Adquisición de habilidades en la formulación y diseño de matrices líquidas y sólidas destinadas al control biológico de agentes patógenos en la agricultura. Selección de materiales, evaluación de propiedades físicas y químicas y optimización de la formulación para obtener las mejores propiedades encapsulantes. Habilidades en el uso de técnicas de evaluación y análisis de matrices, tales como la determinación	Aplicación de los conocimientos teóricos adquiridos durante la formación académica en una situación práctica y real. Se potencializó la capacidad de aplicar los conocimientos en situaciones cotidianas y fortaleció la capacidad de enfrentar desafíos y encontrar soluciones efectivas. Habilidades de investigación y análisis de datos, tales como la recopilación de información relevante, la identificación de patrones y tendencias, y la
		Cultivos vegetales	Clases y laboratorios de cultivos vegetales	Relevancia en el correcto, uso y manejo de cultivos vegetales para la prevención de contaminación.		
		Programación informática mediante el uso de Matlab	Proyecto de cinética de co-cultivo de microorganismos	Adquisición de experiencia en el uso de un co-cultivo a nivel teórico		
		Principios básicos de laboratorio de química orgánica	Laboratorios de química orgánica como materia complementaria	Procesos industriales que usen sustancias y compuestos orgánicos		
		Diseño de experimentos	Clase de diseño de	Optimización de procesos, mejorar la		

			experimentos	calidad del producto y aumentar la eficiencia en la toma de decisiones	de la viabilidad de las cepas encapsuladas y la actividad inhibitoria sobre el fitopatógeno. Trabajo en equipo, comunicación efectiva y liderazgo, enriqueció el aprendizaje al ampliar las perspectivas y compartir conocimientos y experiencias.	interpretación de resultados. Esto potencializó la capacidad de tomar decisiones informadas y fundamentadas en datos objetivos.
	Habilidades	Inglés y alemán	TOEFL y 1 año de alemán	El conocimiento de dos o más idiomas viene de utilidad en la vida laboral		
		Medición de biomasa por peso seco	Proyecto de cinética de crecimiento de *L. plantarum*	Uso de microorganismos en la industria		
		Diseño de primers	Proyecto teórico en biología molecular aplicada	Se tiene la teoría por lo que se puede llevar al laboratorio		
		Siembra por estría	Laboratorio de microbiología	Relevancia general en el laboratorio		
		Uso de superpro para simulación	Proyecto teórico de bioseparaciones	Se simula un proceso a nivel industrial de la extracción de un metabolito		
		Detección de hemolisinas	Laboratorio de	Industria farmacéutica		

			inmunología			
		Clonación de planta	Clases de cultivos vegetales	Industria alimentaria		
		Medición de sustrato por glucosa oxidasa	Proyecto de cinética de crecimiento de *L. plantarum*	Uso de microorganismos en la industria		
	Actitudes	Disposición	Disposición de tiempo para dedicarle a proyectos	Si no existe disposición por parte de los integrantes de un equipo, los proyectos no saldrán acorde lo esperado		
		Trabajo en equipo	Siempre que estoy con personas nuevas en equipos funcionamos bien	La mayoría de los proyectos se llevan a cabo de manera colaborativa		
		Manejo del estrés	Llevé clases de manejo de estrés y ansiedad hace unos meses	El correcto manejo de estrés evita enfermedades		

		Puntualidad	Nunca llego tarde ni a clases, juntas, laboratorios ni trabajo	La puntualidad es importante en todo		

* Importancia o trascendencia que la competencia tiene para tu perfil profesional

El proyecto me permitió fortalecer habilidades de resolución de problemas y toma de decisiones al enfrentar desafíos y buscar soluciones efectivas para lograr los objetivos del proyecto. Esto potencializó la capacidad de analizar situaciones complejas y tomar decisiones informadas y fundamentadas en datos objetivos.

Juan Manuel Alejandro

Categoriza las competencias en conocimientos, habilidades y actitudes. Escribe la o las evidencias de cada competencia y su relevancia.	**Competencia**		**Evidencia**	**Relevancia/Fortaleza***	**Competencias nuevas**	**Competencias Potencializadas**
	Conocimientos	Diseño de procesos	Curso de asignatura Operaciones Unitarias I	Planeación global de experimentos y proyectos que permiten contar con una idea general para la elaboración objetivos y metas destinadas para el mismo. Permite tener una organización de tiempos y acciones necesarias para la realización integral de la propuesta.	Evaluación de la viabilidad del diseño	Planeación global de la experimentación y los proyectos que permiten contar con una idea específica para la elaboración objetivos
		Diseño de metodología	Propuestas de experimentación realizadas en las asignaturas Cinética Química y	Elaboración de conceptual de la estrategia a seguir, paso a paso, para la realización individual de cada una de las	Seguimiento y actualización de las estrategias establecidas	Evaluación de alternativas a la estrategia principal

			Biológica, e Ingeniería de Biorreactores.	metas propuestas en el diseño.		
		Uso de equipos	Asistencia a prácticas y trabajos individuales a los laboratorios de ITESO.	Correcta ejecución independiente de la metodología propuesta en proyectos.	Uso y correlación de nuevos equipos	Corrección de manejo inadecuado de equipos utilizados previamente
	Habilidades	Creatividad	Oportunidades y/o opciones sugeridas para la realización del diseño de proyectos.	Es importante considerar tus materiales, equipos y métodos para la realización de un diseño; es por ello, que la versatilidad de la metodología es importante.	Evaluación de alternativas	Seguimiento de la planeación de la metodología acorde a los materiales y equipos disponibles
		Discriminar fuentes de información	Curso de asignatura Manejo de Información y Datos Numéricos, así como de la realización de investigaciones para resto de materias en el programa.	Para completar la parte teórica de todo experimento resulta de vital importancia el conocer trabajos que antecedieran a tu proyecto; o inclusive situaciones.	Revisar etapas previas del mismo proyecto, si es que aplica	Discriminar trabajos previos acorde a los objetivos específicos del proyecto
	Actitudes	Trabajo colaborativo	Elaboración de proyectos cooperativos a lo largo de la carrera académica que fortalecen la interacción mutua.	Un proyecto siempre se verá beneficiado de la formulación cooperativa y conjunta de diferentes personas. Esto minimiza el riesgo a errores.	Distribución equitativa y heteróloga de las actividades, además de compartir la información homogéneamente	Distribución de actividades acorde a las aptitudes individuales

		Análisis crítico	Revisión analítica de la metodología y resultados de los diferentes proyectos académicos y personales realizados a lo largo de la carrera estudiantil.	Probablemente no se obtengan los resultados esperados; por ello resulta indispensable retroceder a la metodología y revisar si todo se está realizando correctamente.	Discriminar los resultados que siguen a los objetivos del proyecto, y descartar aquellos que no sumen	Revisión de los resultados, de forma que tienen sentido y seguimiento entre ellos

* Importancia o trascendencia que la competencia tiene para tu perfil profesional.

El diseño de estrategias y metodologías me permitió un fuerte sentido discriminativo sobre las diferentes alternativas con las que la realización del proyecto se podía lograr, lo que potencializó sin dudar alguna al análisis crítico.