

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE

Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales.

Desarrollo tecnológico y generación de riqueza sustentable.

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.

Utilización de matriz sólida para el desarrollo de un producto mínimo viable de las cepas biocontroladoras *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Megaterium* y *Micrococcus luteus* en relación con su almacenamiento y viabilidad.

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en biotecnología Alejandra Figueroa Esqueda.

Ing. en biotecnología Astrid S. Vázquez de la Torre.

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

Tlaquepaque, Jalisco, noviembre del 2022.

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP.....	3
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional.....	3
Resumen.....	5
1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional	6
1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto.....	6
1.2 Caracterización de la organización o comunidad.....	11
1.3 Identificación de la(s) problemática(s).....	13
1.4 Planeación de alternativa(s)	13
1.5 Desarrollo de la propuesta de mejora.....	15
1.6 Valoración de productos, resultados e impactos	17
1.7 Bibliografía y otros recursos	25
1.8 Anexos generales	28
2. Productos.....	31
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia.....	33
3.1 Sensibilización ante las realidades	33
3.2 Aprendizajes logrados.....	34

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 este trabajo se realizó un Proyecto de Aplicación Profesional (PAP) matriculado como Ecosistemas de economía circular 4D09, dando seguimiento a trabajos anteriores de este PAP para desarrollar un producto viable de biocontrol con las cepas ya identificadas por MALDI-TOF y evaluadas como *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* y *Micrococcus.luteus*. Cepas con las que se decidió trabajar dada su efectividad que mostraron en las pruebas in vivo, dando apertura a la evaluación de distintas matrices, donde se optó por las matrices sólidas en base a la encapsulación de alginato de sodio cambiando factores como el porcentaje de alginato de sodio y polietilenglicol (PEG) para posteriormente comparar la viabilidad celular de las cepas ya mencionadas. Logrando identificar que la presencia de PEG redujo la presencia de unidades formadoras de colonias al haber realizado la prueba de viabilidad celular a las dos semanas y que el valor de alginato de sodio óptimo para *M. luteus* y *B. megaterium* se encuentra entre 1.4-1.46 y para *B.subtilis* en 3%.

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.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

La agricultura es una actividad vital que impacta directamente en el desarrollo económico de los países, pero el sector enfrenta un problema importante: datos recolectados en el año 2018 mostraron pérdidas de entre el 20 y 30% de la producción anual por afectación de plagas y enfermedades causadas por bacterias y virus principalmente. La manera de combatir la problemática más comúnmente utilizada es la aplicación de insecticidas, fungicidas y nematocidas (Villarreal-Delgado et al., 2018).

En México, para el mismo año mencionado con anterioridad, se estimaba que el 11% de la población laboral se desarrollara en el ámbito agrícola (incluyendo pequeños agricultores y trabajadores temporales) donde el uso de plaguicidas químicos reportado en el 2017 fue de 1.77 kg por hectárea, presentando un aumento del 64% en su aplicación desde el año 2000 debido al aumento de producción y problemas como mecanismos de resistencia por parte de las plagas (OECD, 2021). Sin embargo, el país también ha sido foco de prácticas de manejo de plaguicidas deficientes, siendo sustancias que pueden atentar tanto a la salud humana como al ambiente debido a la contaminación de cuerpos de agua gracias a escurrimiento o erosión de los suelos donde se aplican, por dar unos ejemplos (Hernández & Hansen, 2011).

Gracias a la búsqueda de alternativas al uso de agroquímicos comenzaron a realizarse distintas investigaciones sobre el uso de microorganismos que por naturaleza son capaces de combatir fitopatógenos, de donde nace el biocontrol. En ámbitos tradicionales, el biocontrol se enfoca en el uso y estudio de microorganismos nativos del sustrato de la planta infectada. Dentro de la

misma práctica se han realizado distintas experimentaciones para que su manipulación sea segura para los agricultores (Desgatennes & Corrión, 2021).

De la misma manera se han encontrado cepas con potencial biocontrolador o bioestimulante pero que son patológicas, como es el caso conocido de la compañía AgBiologicas que tuvo que retirar su producto comercial etiquetado como “promotor de crecimiento vegetal” del mercado debido a que la cepa principalmente utilizada, *Burkholderia ambifaria*, causó infecciones en pacientes con fibrosis quística (Rojas-Rojas et al., 2019). Situaciones como esta pueden ser también un foco de oportunidad para la introducción de herramientas de ingeniería genética o ingeniería metabólica para aprovechar la actividad promotora de crecimiento de la bacteria, pero sin la presencia de patogenicidad.

Dentro de las cepas más utilizadas en el control de enfermedades de cultivos es el género *Bacillus*; gracias a estudios moleculares realizados se ha demostrado distintos porcentajes del genoma de distintas cepas pertenecientes al género que se relaciona con la producción de metabolitos secundarios implicados en el control de fitopatógenos, así como también el desarrollo de su implementación exenta de riesgos que puedan atentar a su bioseguridad. A continuación, se presentan tres cepas distintas con potencial biocontrolador y bioestimulante.

Bacillus subtilis

Se trata de una bacteria gram-positiva identificable por su forma de bacilo, tal como se muestra en la Figura 1. Se ha sugerido que puede modificar el ambiente en el que se encuentra a su favor debido a que puede secretar antibióticos y enzimas hidrolíticas, así como a la producción de endosporas resistentes que aseguran la supervivencia de esta en condiciones poco beneficiosas (Branda et al., 2001).

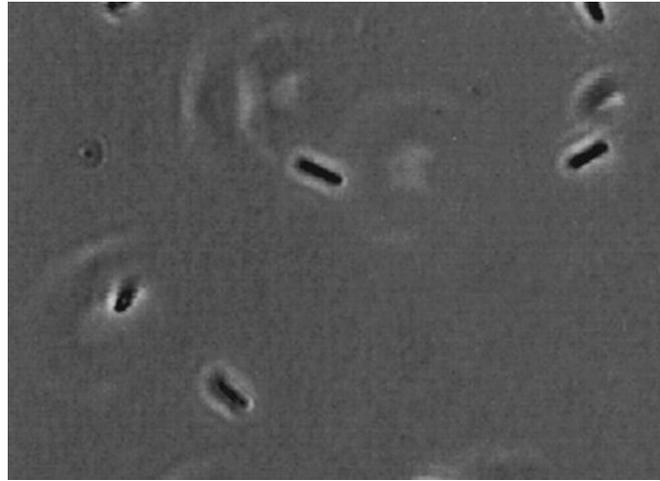


Figura 1. Identificación de *B. subtilis* en microscopio de contraste de fases (Branda et al., 2001)

El potencial biocontrolador de la cepa se deriva de factores definidos como vulnerabilidad del hospedero, virulencia del patógeno y el ambiente en el que se encuentra. La Tabla 1 muestra los mecanismos mayormente estudiados de la bacteria en cuanto a su actividad (Hashem et al., 2019).

Tabla 1. Mecanismos biocontroladores de *B. subtilis* (Hashem et al., 2019)

Mecanismos
Estimulación de potencial antioxidativo
Estimulación de solubilización de potasio
Producción de bacteriocinas
Producción de lipopéptidos y compuestos antibióticos

Producción de enzimas hidrolíticas de la
pared celular

Producción de Iturina A (propiedades
antibióticas y surfactante)

Bacillus megaterium

Esta cepa produce moléculas inhibidoras de fitopatógenos, pero, al igual que *B. subtilis*, tiene la capacidad de formación de endosporas, lo cual es de utilidad para la duración y efectividad de formulaciones comerciales (Acurio Vásconez et al., 2020). Aunque las investigaciones que relacionan su actividad biocontroladora no son tan extensas como en otras especies del mismo género, si se ha encontrado actividad específica hacia hongos toxigénicos (Saleh et al., 2021).

Algunas especies de hongos como *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides*, *Penicillium verrucosum*, etc., producen micotoxinas como metabolitos secundarios, las cuales representan un impacto importante en cuanto a contaminantes de alimentos. En el caso de *B. megaterium*, se ha estudiado el cómo afectan sus compuestos orgánicos volátiles (MVOCs) en la producción de micotoxinas por hongos, mostrando un gran potencial en la inhibición de crecimiento de los patógenos y del metabolito, sobre todo en *Penicillium verrucosum*, con una inhibición del 66.7% (Saleh et al., 2021).

Micrococcus luteus

Se trata de una bacteria Gram-positiva con conformación en cocos (Figura 2). Aunque se ha evaluado el potencial biocontrolador de la especie, ha demostrado resultados importantes como promotor de crecimiento de plantas. La cepa produce ácido indolacético (auxina principal en plantas), el cual se involucra directamente en diferenciación de tejidos, elongación, respuesta a luz, patógenos, gravedad, etc. (Namwongsa et al., 2019).

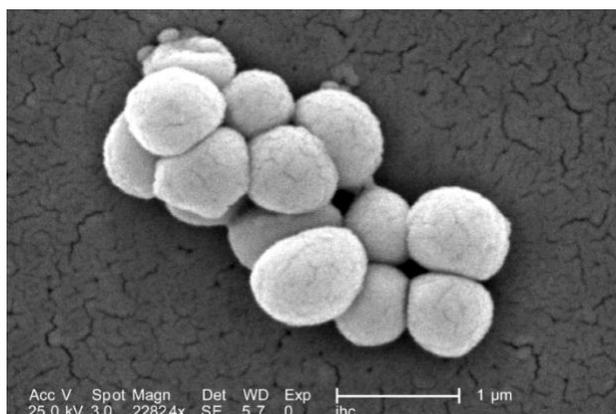


Figura 2. Identificación de M. luteus en microscopio electrónico de barrido (Public Health Image Library, 2007)

En cuanto a bioseguridad de su manipulación, en la literatura no se han encontrado evidencias de que la especie sea patógena, así que son reconocidas generalmente como seguras (GRAS) (Government of Canada, 2018)

Una vez recapituladas las distintas especies con potencial bioestimulante y biocontrolador se puede concretar un paso siguiente: la formulación del producto. Existen distintas patentes con diferentes matrices vigentes en el mercado, desde silicato de potasio para una composición en líquido (Blotsky et al., 2013), hasta poliacrilamida o sílica en el caso de una composición sólida (Bullis et al., 2017).

Una de las herramientas frecuentemente utilizadas es la encapsulación, el cual se fundamenta en la utilización de una matriz polimérica que permite la preservación de un ambiente que puede controlar su interacción con el ambiente al que se expone. En este caso, la microencapsulación es descrita como la técnica que permite obtener una barrera que retarda la interacción del producto con el medio que lo rodea, permitiendo un aumento en la vida útil de este y también una liberación gradual del compuesto encapsulado (Pasin et al., 2012).

El alginato de sodio es un polisacárido que posee la capacidad de absorber agua, inocuidad y es fácil de manipular; de la misma manera tiene propiedades gelificantes y estabilizantes. Este compuesto proviene de algas marinas y se encuentra compuesto de ácido D-manurónico y ácido L-glucorónico; se han reportado resultados en la literatura relacionados con la viabilidad de células microencapsuladas utilizando alginato como matriz, obteniendo un aproximado de 5 años de conservación (Hernández Mendoza et al., 2018).

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.

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 presente proyecto, siendo parte del PAP Biorrefinerías Avanzadas, se encuentra enfocado en el escenario del Biocontrol, siendo asesorado por el Dr. Alejandro Arana Sánchez y el Dr. Luis Eduardo García Segura. Gracias a las investigaciones realizadas en los Proyectos de Aplicación Profesional anteriores fue posible el planteamiento de la formulación de un producto mínimo viable en base a microorganismos identificados en los mismos, obteniendo así dos equipos de trabajo: Lizbeth Valenzuela Rodríguez y Ximena de Unánue Gutiérrez, encargadas de la formulación de producto en matriz líquida, y Astrid Samara Vázquez de la Torre en conjunto con Alejandra Figueroa Esqueda, encargadas de la formulación de producto en matriz sólida; ambos equipos realizaron sus actividades correspondientes en los laboratorios del Parque Tecnológico del ITESO.

1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

En los proyectos llevados a cabo con anterioridad se realizaron diversos procesos, teniendo como resultado desde el aislamiento de cepas y su identificación hasta evaluación su actividad frente a patógenos en ambientes *in vitro* (enfrentamientos) e *in vivo*.

En el año 2021 surgió la convocatoria “Propuestas para el desarrollo de proyectos nacionales de investigación e incidencia para la soberanía alimentaria” impulsada por el Gobierno de México junto con el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), donde una de las temáticas prioritarias promueve la reducción gradual y de manera significativa la utilización de herbicidas, fungicidas, insecticidas, entre otros plaguicidas (CONACYT, 2021), por lo tanto, gracias a los trabajos realizados en el PAP anteriormente es posible realizar la formulación de un producto mínimo viable con cepas que mostraron potencial según los reportes anteriores (*B. subtilis*, *B. megaterium* y *M. luteus*)

1.4 Planeación de alternativa(s)

Para la implementación de un producto eficaz de biocontrol se tomó en cuenta principalmente aumentar la vida de almacén, por lo tanto, la viabilidad celular. Junto con una aplicación fácil y accesible para los agricultores. Para lograrlo se suele mantener en estado líquido y en refrigeración en presencia de sustancias criopreservantes o deshidratando el producto, como se suele hacer por liofilización, siendo el mejor en mantener la viabilidad. Sin embargo, esto aumenta el costo de producción, por lo que se suele optar por alternativas menos costosas. (Montesinos, 2003)

Comparando una formulación líquida, una matriz de microencapsulación y la liofilización, es una alternativa de menor costo, aunque no la más barata, puede mantener la viabilidad a temperatura ambiente por más tiempo que la formulación líquida. Es biodegradable y no tóxico, la viabilidad puede ser extendida a partir de la adición de nutrimentos y aditivos. Cabe destacar que microcápsulas más pequeñas pueden aumentar la eficacia de aplicación al tener mayor área de contacto. Sin embargo, debe plantearse una forma de economizar el proceso.

(Yadav, 2021)

Para extender la viabilidad de la célula y mejorar su preservación con el tiempo, se encontró que añadir minerales como la arcilla de halloisita puede reducir costos y aumentar el tamaño de las cápsulas, aumentando la estabilidad celular y garantizando una aplicación mayor de células (Kadmiri & Mernissi *et al.*, 2020).

En adición a la arcilla, se encontró que en la colección de cultivos CCINHEM se realizan preservaciones semi sólidas en caldo corazón a temperatura ambiente, logrando preservar el 85% de los cultivos bacterianos preservados por 12 años, en su mayoría generando crecimiento y el 87% de los cultivos conservando su pureza (Weng *et al.*, 2005).

Cabe destacar que la adición de polietilenglicol (PEG), mejora la porosidad de las cápsulas y la estabilidad de las cápsulas bajo fuerzas de corte debido a la mejora en las características de las cápsulas como enlaces iónicos y covalentes cruzados, que forman una capa (Alvarado *et al.*, 2018).

Se realizó un diseño de experimentos (diseño factorial mixto) de acuerdo con la información obtenida para definir qué factores influirán más sobre la viabilidad celular, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Experimentos dados por statgraphics.

Experimento	Alginato de sodio (%)	PEG %
0	0	0
1	3.0	0.0
2	2.0	0.0
3	2.0	15.0
4	3.0	10.0
5	2.0	5.0
6	1.0	10.0
7	1.0	20.0

1.5 Desarrollo de la propuesta de mejora

Reactivación de cepas y preparación de medios de cultivo.

Previo al proceso se plantea la elaboración de medios de cultivo, realizando los cálculos necesarios para la preparación de 150 mL de medio LB agar y 200 mL de caldo LB, esterilizándolos junto a los materiales necesarios.

Las cepas seleccionadas (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* y *Micrococcus luteus*) se encuentran criopreservadas a -87°C , por lo tanto, se plantea realizar un descongelamiento gradual, en un inicio de -87°C a -18°C en un periodo de 2 horas, para después continuar de -18°C a 4°C durante 1 hora. Una vez que se encuentre a temperatura ambiente, inocular en 9 mL de caldo LB 500 uL (marcar criovial en uso) e incubar durante 12 horas a 37°C y 150 rpm. Checar turbidez pasando el tiempo y de nuevo al transcurrir 24 horas. Al transcurrir el tiempo, por medio de la técnica de estría cruzada inocular por duplicado en medio LB Lennox a 37°C hasta observar crecimiento de colonias (Castro, 2020).

Preparación de las soluciones.

Preparar solución de alginato de sodio en concentración del 2% (w/v). En un vaso de precipitado con mosca y placa agitadora, calentar el volumen deseado y poco a poco colocar el alginato de sodio, batir hasta disolver cualquier rastro de grumos.

Preparar el medio, variando las concentraciones según el diseño de experimentos. En caso de que se indique no trabajar con caldo corazón, se debe trabajar con medio MRS. Preparar medio LB Lennox para verter en cajas Petri posteriormente y colocar una manguera vaso de precipitado por cepa (3) en sobre de aluminio/tapa de aluminio correspondientemente. Esterilizar las soluciones mencionadas a 121°C durante 15 min. Una vez esterilizado, verter aproximadamente 25 mL de medio por caja Petri (9), dejar enfriar y guardar en bolsa estéril.

Encapsulación en alginato de sodio.

Inocular un tubo Falcon con el medio y cepa a utilizar, se toma con el asa de las cajas Petri obtenidas a un volumen 10/2 mL de solución de alginato de sodio. Hacer dos tubos por cepa. Dejar incubando de 18 a 48 horas a 35°C y 120 rpm.

Con una jeringa estéril (31G x 6mm, 1 por cepa), gotear la solución de alginato de sodio en 100 mL de CaCl₂ 1 M en agitación con ayuda de una bomba peristáltica, cambiando de manguera y vaso de precipitado entre cada experimento, tal como se muestra en el material de la Figura . Una vez obtenidas las microcápsulas, enjuagar con agua estéril.

Dejar secar a 40 °C hasta obtener un peso constante y colocar en tubos estériles bien sellados. Dejar en almacenamiento a 4 °C durante dos semanas para su posterior análisis de viabilidad.

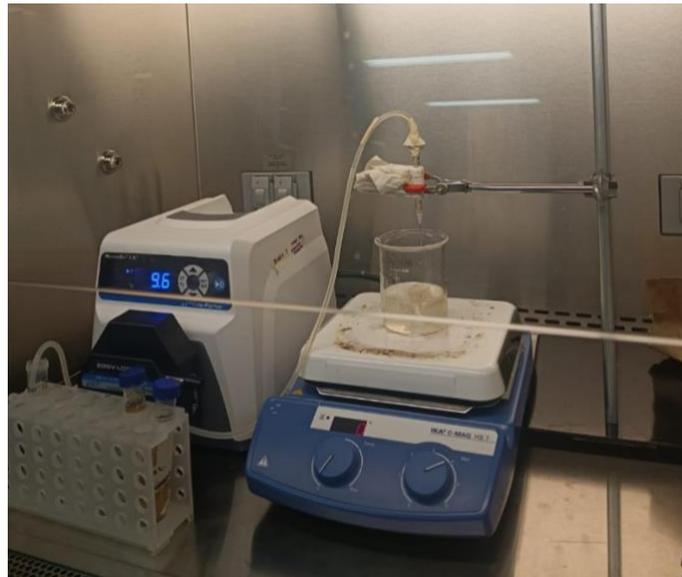


Figura 3. Proceso de encapsulación.

Evaluación de viabilidad celular.

Se toma el tubo Falcon del duplicado, realizando diluciones en tubos Eppendorf hasta 10⁸. Posteriormente, colocar 100 µL por caja petri y etiquetar adecuadamente (como se

muestra en la Figura). Dejar incubando a 37°C de 18 a 48 horas para posteriormente realizar el conteo; el procedimiento mencionado se utilizó para observar el crecimiento promedio previo a la encapsulación.



Figura 4. Realización del procedimiento de diluciones para conteo de colonias.

Una vez realizadas las microencapsulaciones suspender 5 cápsulas en 1 mL de solución fisiológica, aplicar agitación durante 15 minutos y realizar diluciones de la solución obtenida (10^1 , 10^2 , 10^3). Sembrar 100 μ L en cajas Petri con medio LB Lennox y dejar incubando a 37°C de 18 a 48, para posteriormente realizar un conteo de colonias y realizar comparaciones con las viabilidades base realizadas inicialmente.

1.6 Valoración de productos, resultados e impactos

En la Figura 5 se puede visualizar el producto realizado: microcápsulas realizadas con aligato de sodio y polietilenglicol a distintas concentraciones.



Figura 5. Microcápsulas de alginato de sodio.

En la Tabla 3 se muestran los resultados del conteo inicial de cada cepa, el cual fue de utilizado para obtener el porcentaje de viabilidad posterior a la encapsulación.

Tabla 2. Datos recolectados del conteo oficial.

Conteo inicial	
Cepa	UFC/mL
<i>M.luteus</i>	4.50E+05
<i>B.megatherium</i>	3.30E+06
<i>B.subtilis</i>	7.00E+06

Una vez disueltas las microcápsulas después de dos semanas de almacenamiento se realizaron conteos en caja Petri tomando en cuenta sus diluciones respectivas, obteniendo así los datos reportados en la Tabla 3, permitiendo de la misma manera calcular el porcentaje de viabilidad en cada experimento.

Tabla 3. Viabilidad para cada cepa.

Alginato	PEP	Cepa	Dilucion	Colonias	UFC/mL	Promedio	Viabilidad
0	0	<i>M.luteus</i>	10	28	1.40E+05	1.20E+05	27%
			100	2	1.00E+05		
			1000	0	0.00E+00		
		<i>B.megatherium</i>	10	-	-	1.10E+06	33.3%
			100	24	1.20E+06		
			1000	2	1.00E+06		
		<i>B.subtilis</i>	10	22	1.10E+05	1.30E+05	2%
			100	3	1.50E+05		
			1000	0	0.00E+00		
3	0	<i>M.luteus</i>	10	50	2.50E+05	1.75E+05	39%
			100	2	1.00E+05		
			1000	0	0.00E+00		

			10	-	-			
		<i>B.megatherium</i>	100	26	1.30E+06	1.40E+06	42.4%	
			1000	3	1.50E+06			
			10	-	-			
		<i>B.subtilis</i>	100	-	-	6.00E+06	86%	
			1000	12	6.00E+06			
			10	-	-			
		<i>M.luteus</i>	100	6	3.00E+05	4.00E+05	89%	
			1000	1	5.00E+05			
			10	-	-			
2	0	<i>B.megatherium</i>	100	35	1.75E+06	1.88E+06	56.8%	
			1000	4	2.00E+06			
			10	-	-			
		<i>B.subtilis</i>	100	100	5.00E+06	5.75E+06	82%	
			1000	13	6.50E+06			
			10	84	4.20E+05			
		<i>M.luteus</i>	100	3	1.50E+05	2.85E+05	63%	
			1000	0	0			
			10	1	5.00E+03			
2	15	<i>B.megatherium</i>	100	0	0	2.50E+03	0.1%	
			1000	0	0			
			10	2	1.00E+04			
		<i>B.subtilis</i>	100	0	0	1.00E+04	0.1%	
			1000	0	0			
			10	20	1.00E+05			
		<i>M.luteus</i>	100	3	1.50E+05	1.25E+05	28%	
			1000	0	0			
			10	8	4.00E+04			
3	10	<i>B.megatherium</i>	100	1	5.00E+04	4.50E+04	1.4%	
			1000	0	0			
			10	4	2.00E+04			
		<i>B.subtilis</i>	100	0	0	2.00E+04	0.3%	
			1000	0	0			
			10	0	0			
		<i>M.luteus</i>	100	0	0	0.00E+00	0%	
			1000	0	0			
			10	0	0			
2	5	<i>B.megatherium</i>	100	0	0	0.00E+00	0.0%	
			1000	0	0			
			10	6	3.00E+04			
		<i>B.subtilis</i>	100	1	5.00E+04	4.00E+04	0.6%	
			1000	0	0			
			10	-	-			
1	10	<i>M.luteus</i>	100	18	9.00E+05	4.50E+05	100%	
			1000	0	0			
		<i>B.megatherium</i>	10	-	-	3.08E+06	93.2%	

			100	3	1.50E+05		
			1000	12	6.00E+06		
			10	126	6.30E+05		
		<i>B.subtilis</i>	100	6	3.00E+05	8.10E+05	12%
			1000	3	1.50E+06		
			10	18	9.00E+04		
		<i>M.luteus</i>	100	1	5.00E+04	9.00E+04	20%
			1000	0	0		
			10	108	5.40E+05		
1	20	<i>B.megatherium</i>	100	3	1.50E+05	3.45E+05	10.5%
			1000	0	0		
			10	303	1.52E+06		
		<i>B.subtilis</i>	100	30	1.50E+06	1.52E+06	22%
			1000	0	0		

Una vez obtenidos los datos anteriores, estos fueron sometidos a análisis estadísticos en Statgraphics para evaluar si realmente los componentes utilizados tienen un impacto significativo en la viabilidad de los microorganismos. Para los tres microorganismos se obtuvieron los mismos análisis: análisis de varianza, obtención de una ecuación por medio de coeficientes de regresión y la superficie de respuestas para conocer la formulación óptima para cada cepa; todos los datos se encuentran ilustrados en las Tablas 4, 5 y 6, Gráficas 1, 2 y 3 y Figuras 6, 7 y 8.

Tabla 4. ANOVA obtenido de resultados con *M. luteus*.

Analysis of Variance for Viabilidad					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Alginato de sodio	740.176	1	740.176	0.31	0.6139
B:PEG	396.043	1	396.043	0.17	0.7090
AA	1284.65	1	1284.65	0.55	0.5134
AB	1.75757	1	1.75757	0.00	0.9799
Total error	7053.12	3	2351.04		
Total (corr.)	8579.5	7			

Regression coeffs. for Viabilidad

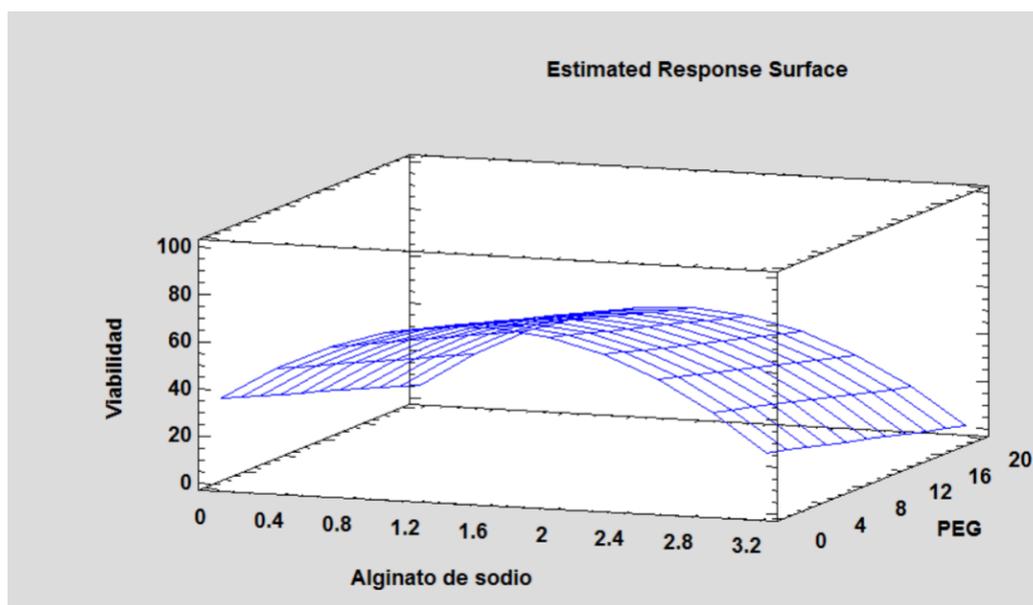
Coefficient	Estimate
constant	35.4024
A:Alginato de sodio	48.2124
B:PEG	-1.43008
AA	-16.1029
AB	0.0890501

The StatAdvisor

This pane displays the regression equation which has been fitted to the data. The equation of the fitted model is

$$\text{Viabilidad} = 35.4024 + 48.2124 \cdot \text{Alginato de sodio} - 1.43008 \cdot \text{PEG} - 16.1029 \cdot \text{Alginato de sodio}^2 + 0.0890501 \cdot \text{Alginato de sodio} \cdot \text{PEG}$$

Figura 6. Coeficientes de regresión obtenidos de resultados con *M. luteus*.



Gráfica 1. Superficie de respuesta obtenida de resultados con *M. luteus*.

Tabla 5. ANOVA obtenido de resultados con *B. megaterium*.

Analysis of Variance for Viabilidad

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Alginato de sodio	2029.02	1	2029.02	1.31	0.3359
B:PEG	2479.78	1	2479.78	1.60	0.2956
AA	62.98	1	62.98	0.04	0.8533
AB	1023.7	1	1023.7	0.66	0.4762
Total error	4657.55	3	1552.52		
Total (corr.)	7868.69	7			

Regression coeffs. for Viabilidad

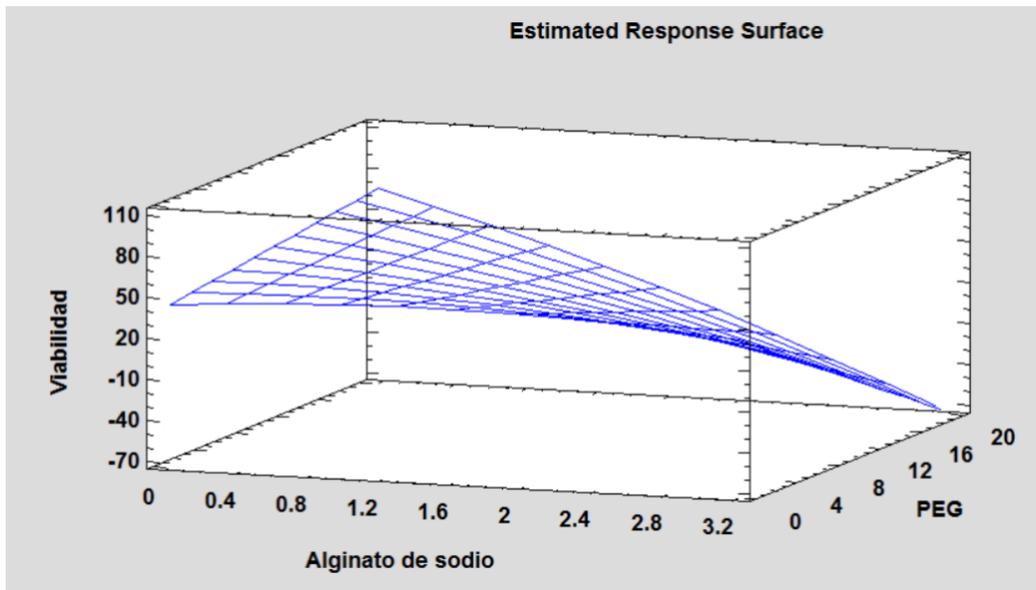
Coefficient	Estimate
constant	43.8854
A:Alginato de sodio	10.4069
B:PEG	1.16549
AA	-3.56544
AB	-2.14914

The StatAdvisor

This pane displays the regression equation which has been fitted to the data. The equation of the fitted model is

$$\text{Viabilidad} = 43.8854 + 10.4069 \cdot \text{Alginato de sodio} + 1.16549 \cdot \text{PEG} - 3.56544 \cdot \text{Alginato de sodio}^2 - 2.14914 \cdot \text{Alginato de sodio} \cdot \text{PEG}$$

Figura 7. Coeficientes de regresión obtenidos de resultados con *B. megaterium*.



Gráfica 2. Superficie de respuesta obtenida de resultados con *B. megaterium*.

Tabla 6. ANOVA obtenido de resultados con *B. subtilis*.

Analysis of Variance for Viabilidad					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Alginato de sodio	394.447	1	394.447	0.56	0.5071
B:PEG	5363.06	1	5363.06	7.67	0.0696
AA	66.2991	1	66.2991	0.09	0.7783
AB	3222.77	1	3222.77	4.61	0.1210
Total error	2097.41	3	699.137		
Total (corr.)	8948.96	7			

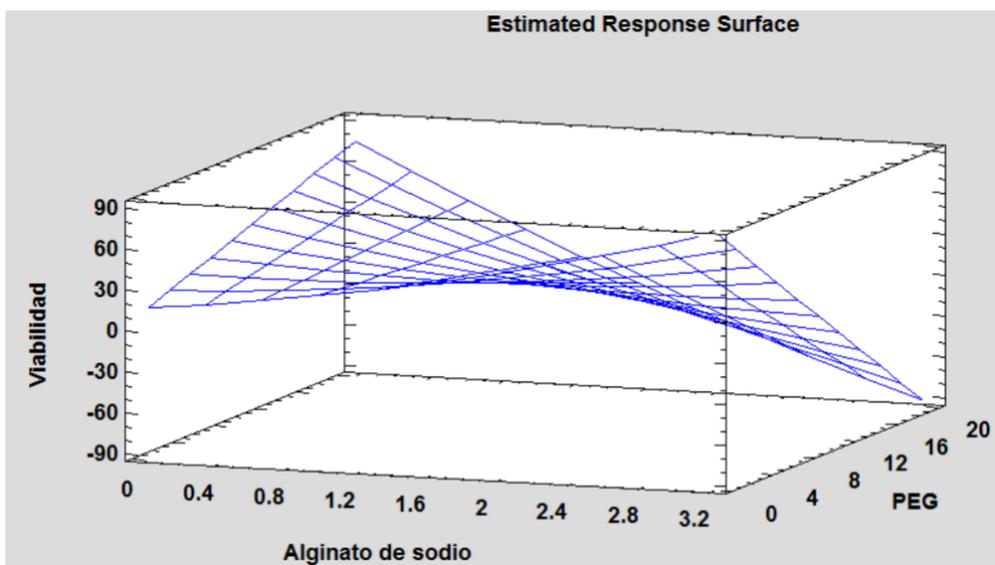
Regression coeffs. for Viabilidad	
Coefficient	Estimate
constant	16.5706
A:Alginato de sodio	12.3241
B:PEG	3.01931
AA	3.65818
AB	-3.81323

The StatAdvisor

This pane displays the regression equation which has been fitted to the data. The equation of the fitted model is

$$\text{Viabilidad} = 16.5706 + 12.3241 \cdot \text{Alginato de sodio} + 3.01931 \cdot \text{PEG} + 3.65818 \cdot \text{Alginato de sodio}^2 - 3.81323 \cdot \text{Alginato de sodio} \cdot \text{PEG}$$

Figura 8. Coeficientes de regresión obtenidos de resultados con *B. subtilis*.



Gráfica 3. Superficie de respuesta obtenida de resultados con *B. subtilis*.

Para poder validar la hipótesis planteada, la cual implicaba el impacto positivo de alginato de sodio o polietilenglicol (o su conjunto) en la maximización de viabilidad de las bacterias microencapsuladas, es necesario que en el análisis de varianza los valores de P (P-value) presente un valor menor a 0.05 (Ali & Bhaskar, 2016). Siguiendo la lógica anterior, los análisis de varianza de las tres cepas (Tabla 4, 5 y 6) revelan que los componentes no tienen un impacto significativo en aumentar la viabilidad.

Por otro lado, se si se pudieron obtener resultados como la formulación óptima de las microcápsulas gracias a la superficie de respuesta, así como una ecuación para poder estimar la viabilidad dependiendo de la formulación. La Tabla 7 muestra las formulaciones óptimas para cada cepa.

Tabla 7. Composiciones adecuadas para aumentar la viabilidad de las cepas microencapsuladas.

Cepa	Composición	
	% Alginato de sodio	% PEG
<i>M.luteus</i>	1.4	3.80E-03
<i>B.megatherium</i>	1.46	5.80E-10
<i>B.subtilis</i>	3	0

Como se puede visualizar en la Tabla 7, en las formulaciones capturadas la cantidad de polietilenglicol no es realmente significativa en comparación a la de alginato, incluso en la Tabla 3 se puede recolectar que los experimentos con menor viabilidad presentaban PEG en su formulación. Aunque en la teoría se menciona que el polietilenglicol impacta en la estabilidad y porosidad de las cápsulas, los resultados recolectados muestran que puede no ser la mejor opción para mantener la viabilidad de las cepas.

Es importante recalcar dos puntos importantes en la experimentación: las microcápsulas únicamente se almacenaron durante dos semanas y se disolvieron en solución salina. Es necesario analizar la viabilidad a distintos tiempos de almacenamiento y también las condiciones de este considerando que en este caso se mantuvieron en refrigeración con una cubierta de aluminio para evitar la intromisión de luz, y si es posible realizar un proceso de vida acelerada para analizar la respuesta a largo plazo.

Por otro lado, en cuanto a la manera de disolver las cápsulas, después de realizar la experimentación se encontraron protocolos en donde se utilizaba citrato de sodio, el cual disgrega por completo el gel de alginato (Silvina et al., 2019); el uso de citrato tiene una mejor funcionalidad que la solución salina, por lo tanto, puede que su aplicación mejore los resultados de liberación de los microorganismos y, consigo, la viabilidad.

1.7 Bibliografía y otros recursos

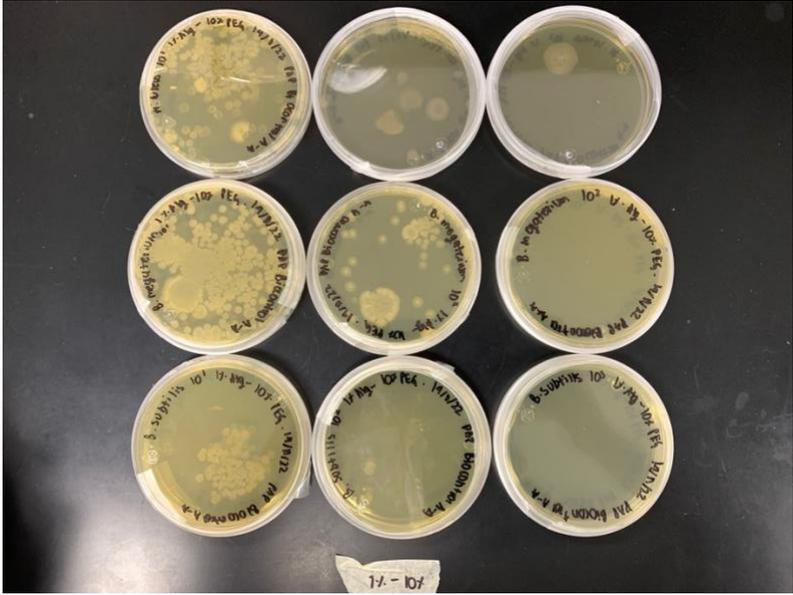
- Acurio Vásconez, R. D., Tenorio Moya, E. M., Collaguazo Yépez, L. A., Chiluisa-Utreras, V. P., & Vaca Suquillo, I. de los Á. (2020). Evaluation of *Bacillus megaterium* strain AB4 as a potential biocontrol agent of *Alternaria japonica*, a mycopathogen of *Brassica oleracea* var. *italica*. *Biotechnology Reports*, 26, e00454. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2020.E00454>
- Alvarado, Y., Muro, C., Rivero, I., Pina, G., Illescas, J. & Díaz, M. (2018) Encapsulation of *Bacillus subtilis* cells for production of whey protein hydrolysates. *Applied Biochemistry and Microbiology*. DOI: 10.1134/S000368318100010
- Ali, Z., & Bhaskar, S. B. (2016). Basic statistical tools in research and data analysis. *Indian Journal of Anaesthesia*, 60(9), 662. <https://doi.org/10.4103/0019-5049.190623>
- Blotsky, L., Derez, Z., & Michael, L. (2013). *Methods and compositions of biocontrol of plant pathogens* (Patent No. US10603343B2). Caister Academic. <https://patents.google.com/patent/US10603343B2/en?q=biocontrol&oq=biocontrol>
- Branda, S. S., González-Pastor, J. E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., & Kolter, R. (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), 11621–11626. <https://doi.org/10.1073/PNAS.191384198/ASSET/F573E7FC-4CE5-41DA-ADBB-DA6299C25D1B/ASSETS/GRAPHIC/PQ1913841004.JPEG>
- Bullis, D., Grandlic, C., McCann, R., & Kerovuo, J. (2017). Plant growth-promoting microbes and uses therefor (Patent No. US10772334B2). In *FEMS Microbiol Lett* (US10772334B2).
- Castro, J. F. (2020). *Conformación de colecciones de cultivos microbianos*. <https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/6945>
- CONACYT. (2021). *PROPUESTAS PARA EL DESARROLLO DE PROYECTOS NACIONALES DE INVESTIGACIÓN E INCIDENCIA PARA LA SOBERANÍA ALIMENTARIA*.
- Desgatennes, D., & Corrión, G. (2021). *El biocontrol en la era del microbioma*. <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/2013-06-05-10-34-10/17-ciencia-hoy/1057-el-biocontrol-en-la-era-del-microbioma>
- Government of Canada. (2018). *Micrococcus luteus*. <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/chemical-substances/fact-sheets/chemicals-glance/micrococcus-luteus.html>
- Hashem, A., Tabassum, B., & Fathi Abd_Allah, E. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological*

- Sciences*, 26(6), 1291–1297. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2019.05.004>
- Hernández Mendoza, J. L., Hinojosa López, P. L., Salazar Bravo, Á., García Olivares, J. G., Rodríguez Castillejos, G. C., & Quiroz Velásquez, J. D. C. (2018). Conservación por microencapsulación de bacterias de uso agrícola: *Azospirillum Brasilense*. *Revista Boliviana de Química*, 35(4), 117–122. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S025054602018000400002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Hernández-Antonio, A., & Hansen, A. (2011). Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 27(2), 115–127. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992011000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Kadmiri, I., Mernissi, N., Azaroual, S., Mekhzoum, M., Qaiss, A & Bouhfid, R. (2020) Bioformulation of microbial fertilizer bases on clay and alginate encapsulation. Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02262-2>
- Kadmiri, I.M, Mernissi N.E, Azaroual, S.E, Mekhzoum M. E, Qaiss A.E & Bouhfid, R. (2020). Bioformulation of microbial fertilizar on clay and alginate encapsulation. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02262-2>
- Montesinos, E. (2003). Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. Springer- Verlag. DOI 10.1007/s10123-003-0144-x
- Namwongsa, J., Jogloy, S., Vorasoot, N., Boonlue, S., Riddech, N., & Mongkolthananruk, W. (2019). Endophytic Bacteria Improve Root Traits, Biomass and Yield of *Helianthus tuberosus* L. under Normal and Deficit Water Conditi. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 29(11), 1777–1789. <https://doi.org/10.4014/JMB.1903.03062>
- OECD. (2021). Gobernanza Regulatoria en el Sector de Plaguicidas de México. *Gobernanza Regulatoria En El Sector de Plaguicidas de México*. <https://doi.org/10.1787/B4805EB5-ES>
- Pasin, B., Azón, C., & Garriga, A. (2012). *Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones*. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), . https://redib.org/Record/oai_articulo267574-microencapsulaci%C3%B3n-con-alginato-en-alimentos-t%C3%A9cnicas-y-aplicaciones
- Public Health Image Library. (2007). *Micrococcus luteus*.

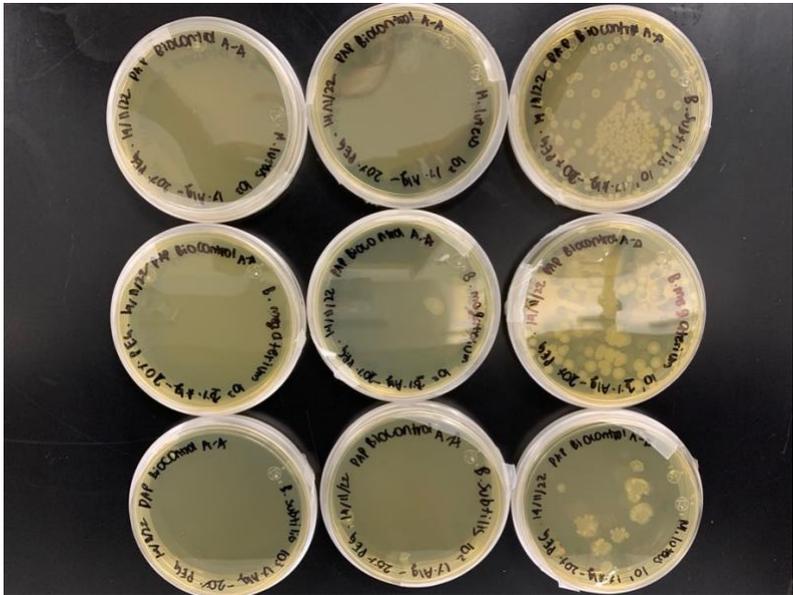
<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=9759>

- Rojas-Rojas, F. U., López-Sánchez, D., Meza-Radilla, G., Méndez-Canarios, A., Ibarra, J. A., & Estrada-de los Santos, P. (2019). El controvertido complejo Burkholderia cepacia, un grupo de especies promotoras del crecimiento vegetal y patógenas de plantas, animales y humanos. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(1), 84–92. <https://doi.org/10.1016/J.RAM.2018.01.002>
- Saleh, A. E., Ul-Hassan, Z., Zeidan, R., Al-Shamary, N., Al-Yafei, T., Alnaimi, H., Higazy, N. S., Migheli, Q., & Jaoua, S. (2021). Biocontrol Activity of Bacillus megaterium BM344-1 against Toxigenic Fungi. *ACS Omega*, 6(16), 10984–10990. https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.1C00816/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AO1C00816_M002.GIF
- Silvina, G., Novello, L., Hernan, L., Armando, F., & Judit, V. (2019). Cápsulas de alginato para la protección de polifenoles presentes en el aceite esencial de orégano. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 24(59), 297–309. <https://doi.org/10.33255/3059/687>
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., Santos-Villalobos, S. de los, Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & Santos-Villalobos, S. de los. (2018). El género Bacillus como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1), 95–130. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>
- Weng, z, Junco R.D, Díaz O.E, Álvarez Beltrán J.R, Rodríguez M.C. (2005) Conservación bacteriana po método simple a temperatura ambiente: una alternativa viable. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* [Internet]. 2005;43(2):. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223214845004>
- Yadav, A. (2021) Soil Microbiomes for Sustainable Agriculture. 14.8.5 Cell Immobilization formulations. Pg.447 <https://doi.org/10.1007/978-3-030-73507-4>

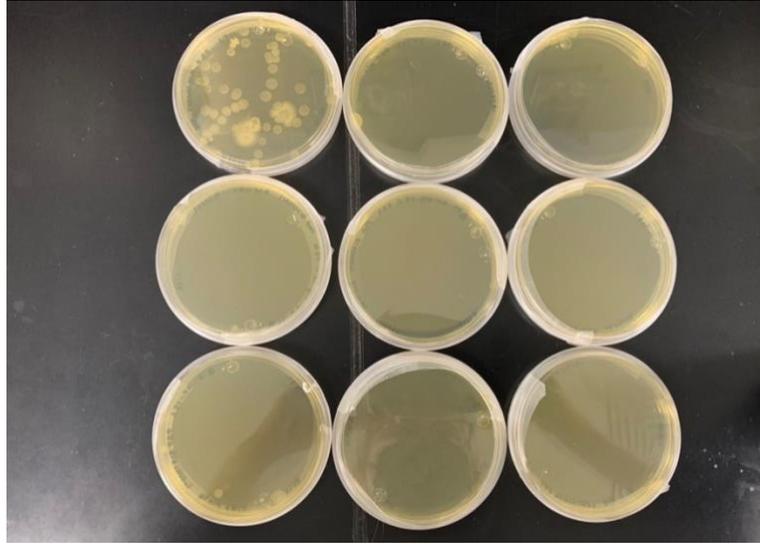
1.8 Anexos generales



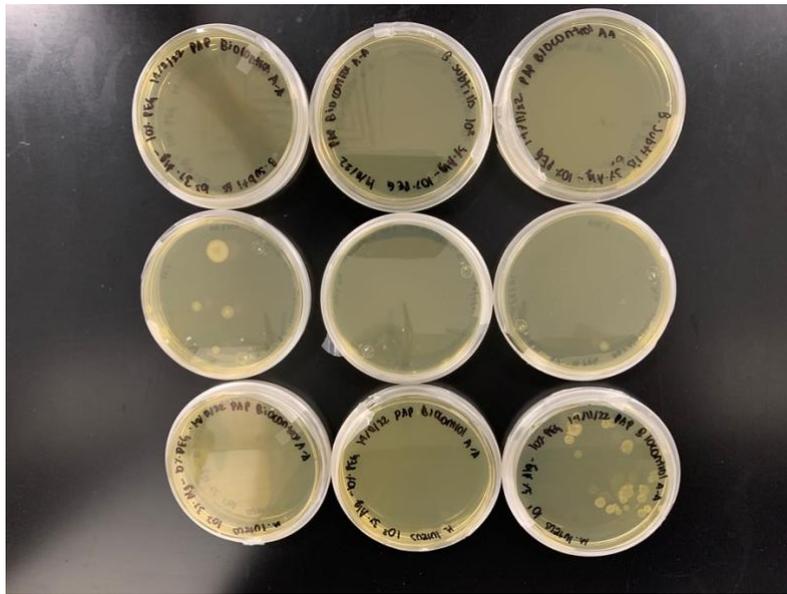
Anexo 1. Prueba de viabilidad celular a las dos semanas para el tratamiento de 1% alginato de sodio y 10% de PEG para las cepas evaluadas en diluciones de 10^1 , 10^2 , 10^3 .



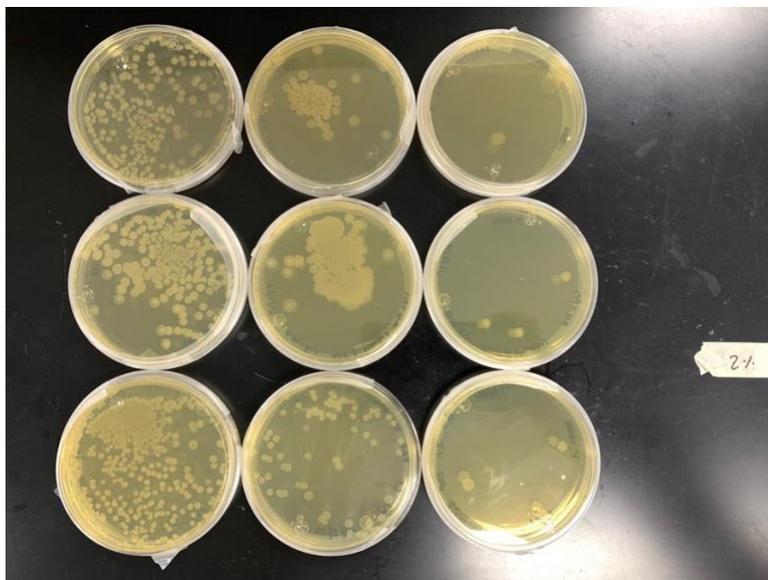
Anexo 2. Prueba de viabilidad celular a las dos semanas para el tratamiento de 1% alginato de sodio y 20% de PEG para las cepas evaluadas en diluciones de 10^1 , 10^2 , 10^3 .



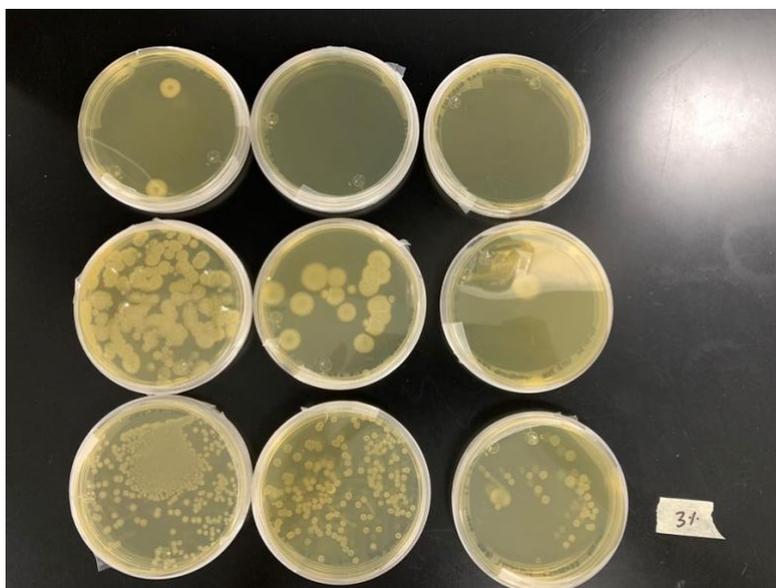
Anexo 3. Prueba de viabilidad celular a las dos semanas para el tratamiento de 2% alginato de sodio y 5% de PEG para las cepas evaluadas en diluciones de 10^1 , 10^2 , 10^3 .



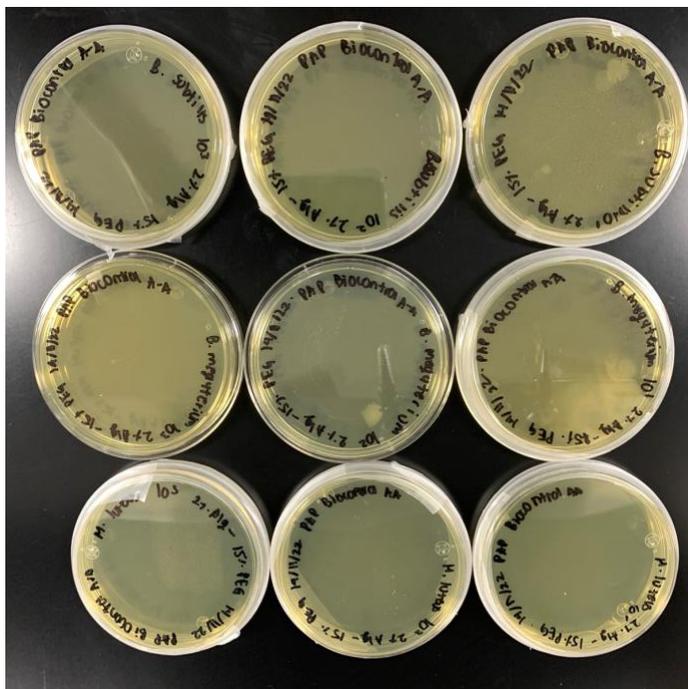
Anexo 4. Prueba de viabilidad celular a las dos semanas para el tratamiento de 3% alginato de sodio y 10% de PEG para las cepas evaluadas en diluciones de 10^1 , 10^2 , 10^3 .



Anexo 5. Prueba de viabilidad celular a las dos semanas para el tratamiento de 2% alginato de sodio y 0% de PEG para las cepas evaluadas en diluciones de 10^1 , 10^2 , 10^3 .



Anexo 6. Prueba de viabilidad celular a las dos semanas para el tratamiento de 3% alginato de sodio y 0% de PEG para las cepas evaluadas en diluciones de 10^1 , 10^2 , 10^3 .



Anexo 7. Prueba de viabilidad celular a las dos semanas para el tratamiento de 2% alginato de sodio y 15% de PEG para las cepas evaluadas en diluciones de 10^1 , 10^2 , 10^3 .

2. Productos

Nombre y código del PAP (como en la carátula):	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:	Reporte PAP
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	El documento contiene una recapitulación que fundamenta la investigación, la metodología realizada a lo largo del proyecto y los resultados observados, en base a una microencapsulación de distintas cepas reportadas como biocontroladoras o bioestimulantes. El documento se realizó para aportar información en

	el repositorio institucional y también para poder tener un seguimiento en semestres posteriores.
Autores:	Astrid Salara Vázquez de la Torre Alejandra Figueroa Esqueda

Nombre y código del PAP (como en la carátula):	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:	Microcápsulas de alginato de sodio
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Microcápsulas de tres cepas distintas: <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus megaterium</i> y <i>Micrococcus luteus</i> , realizadas con alginato de calcio, polietilenglicol y medio de cultivo caldo-corazón; estas se realizaron con el objetivo de poder realizar pruebas <i>in vivo</i> en proyectos posteriores, así como análisis de propiedades biocontroladoras.
Autores:	Astrid Salara Vázquez de la Torre Alejandra Figueroa Esqueda

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

Alejandra Figueroa: en el PAP que estuve anteriormente (el cual tenía relación con la agricultura en el estado de Jalisco) si tuve la oportunidad de tener contacto con productores y agricultores, por lo tanto, pude conectar con la necesidad de ellos en utilizar alternativas a los agroquímicos, así como el impacto negativo que estos tienen en su salud, aunque no siempre se tome en cuenta por priorizar la producción de los cultivos. El haber podido involucrarme directamente en la realización de un producto que les sea de utilidad y que aporte en una de las principales actividades del país me ayudó a darme cuenta del impacto de mi carrera y de lo que puedo aportar a la sociedad con mi conocimiento y los materiales disponibles en la institución.

Astrid Vázquez: aportar en este proyecto me hizo reflexionar de forma un poco más tangible acerca de las afectaciones que pueden tener productos que se usan cotidianamente como lo son los plaguicidas y acerca de las formas en que se pueden aportar a través del ámbito de la biotecnología para evitar el uso de dichos compuestos. A pesar de estar estudiando esta carrera considero que el biocontrol era una alternativa poco presente para mí y aprender sobre esta opción sustentable que busca evitar afectaciones a la salud humana y al ecosistema me hizo concientizarme sobre esta problemática y todo lo que rodea a la industria alimenticia. Por lo que considero importante crear opciones que sean accesibles y confiables para acelerar su implementación en los campos.

3.2 Aprendizajes logrados

Alejandra Figueroa: comenzar un proyecto desde cero fue un reto al que no estoy acostumbrada. En clases, sobre todo en el área de laboratorio, los protocolos nos los proporcionan y generalmente los profesores están ahí todo el tiempo en caso de dudas. En el caso de este proyecto nosotras tuvimos que realizar el protocolo ya sea con ayuda de literatura o con los RPAPs anteriores, e intentamos preguntar las dudas que se nos presentaban con nuestros asesores, pero la mayor parte del tiempo estuvimos por nuestra cuenta en las instalaciones, lo cual fue una experiencia esencial para mi desarrollo profesional dentro del laboratorio.

En cuanto el trabajo en equipo, aunque las dos procuramos estar en todos los procesos experimentales, en caso de que alguna actividad no se acomodara con nuestros horarios nos las repartíamos de manera equitativa para ambas estar involucradas por completo en el desarrollo del proyecto, para mí esta fue una experiencia satisfactoria.

Astrid Vázquez: al avanzar durante el curso de la carrera cada vez logramos un nivel de independencia mayor en dirigir y plantear proyectos, lo cual puede llegar a ser retador, por ello se tuvo que mantener el compromiso y motivación para alcanzar los resultados deseados. En lo personal este semestre al llevar otras materias tuve que ser más estricta con mis tiempos para realizar todos los experimentos y pruebas que realizamos en laboratorio. También inicialmente se planteaba usar un compuesto que por cuestiones administrativas no se lograron obtener en tiempo, por lo que se tuvo que hacer un rediseño de los tratamientos y al ya haber investigado bastante de tema, logramos tomar la decisión en tiempo de sustituir dicho compuesto con uno que ya se encontraba en laboratorio.

Otros aprendizajes fueron el tema de la comunicación, ya que para obtener un buen trabajo en equipo estuvimos comunicándonos diariamente para acordar tiempos y tomar decisiones tomadas en el proyecto, en donde con ayuda de nuestros profesores logramos obtener los resultados esperados.