



REPÚBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

FACULTAD DE POSGRADOS

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN APLICADA PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE:**

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA:

Microencapsulación de *Bacillus velezensis*, aplicada a la formulación de
un bioinsumo agrícola

AUTOR:

Calazacón Satiaca Mery Vanessa

TUTOR:

Cruz Sarmiento Darío Javier PhD.

MILAGRO, 2026

Derechos de Autor

Sr. Dr.

Fabricio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Yo, **Mery Vanessa Calazacón Satiaca**, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de **Magíster en Biotecnología**, como aporte a la Línea de Investigación en **Obtención, transformación o caracterización de materia prima** de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Proyecto de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, **08 de julio del 2026**



Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
**MERY VANESSA
CALAZACON SATIACA**

Mery Vanessa Calazacón Satiaca

C.I.: 1724858608

Aprobación del Tutor del Trabajo de Titulación

Yo, **Darío Javier Cruz Sarmiento**, en mi calidad de tutor del trabajo de titulación, elaborado por **Mery Vanessa Calazacón Satiaca**, cuyo tema es **Microencapsulación de *Bacillus velezensis*, aplicada a la formulación de un bioinsumo agrícola**, que aporta a la Línea de Investigación **en Obtención, transformación o caracterización de materia prima** previo a la obtención del Grado **Magíster en Biotecnología**. Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo **APRUEBO**, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 08 de julio del 2026



Darío Javier Cruz Sarmiento PhD.

C.I.: 1104012016

ACTA DE CALIFICACIÓN



FACULTAD DE POSGRADO

ACTA DE SUSTENTACIÓN

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

En la Facultad de Posgrado de la Universidad Estatal de Milagro, a los veinticuatro días del mes de septiembre del año dos mil veintiseis., siendo las 10:30 horas, de forma VIRTUAL comparece el/la maestrante, ING CALAZACON SATIACA MERY VANESSA, a defender el Trabajo de Titulación denominado " **MICROENCAPSULACIÓN DE BACILLUS VELEZENSIS, APLICADA A LA FORMULACIÓN DE UN BIOINSUMO AGRÍCOLA**", ante el Tribunal de Calificación integrado por: Mgs. BARZALLO GRANIZO DIEGO GEOVANNY, Presidente(a), Msc GARCES MONCAYO MARÍA FERNANDA en calidad de Vocal; y, SEVILLA CARRASCO JAIME DAVID que actúa como Secretario/a.

Una vez defendido el trabajo de titulación; examinado por los integrantes del Tribunal de Calificación, escuchada la defensa y las preguntas formuladas sobre el contenido del mismo al maestrante compareciente, durante el tiempo reglamentario, obtuvo las siguientes calificaciones:

TRABAJO DE TITULACION	60.00
DEFENSA ORAL	38.60
PROMEDIO	98.60
EQUIVALENTE	EXCELENTE

Para constancia de lo actuado firman en unidad de acto el Tribunal de Calificación, siendo las 11:30 horas.



Firmado electrónicamente por:
**DIEGO GEOVANNY
BARZALLO GRANIZO**

DC PH CH. BARZALLO GRANIZO DIEGO GEOVANNY
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:
**MARIA FERNANDA
GARCES MONCAYO**

MSC GARCES MONCAYO MARÍA FERNANDA
VOCAL



Firmado electrónicamente por:
**JAIME DAVID
SEVILLA CARRASCO**

SEVILLA CARRASCO JAIME DAVID
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:
**MERY VANESSA
CALAZACON SATIACA**

CALAZACON SATIACA MERY VANESSA
MAESTRANTE

Dedicatoria

Dedico este Trabajo de Titulación a mis padres, quienes han sido el pilar fundamental en mi vida, brindándome su apoyo incondicional y creer siempre en mí. Este logro es gracias a ustedes y su esfuerzo de día a día, esfuerzo que me ha permitido abrir caminos y oportunidades. Gracias por creer en mí, por apoyarme y sobre todo por enseñarme que juntos en familia cualquier meta es posible lograrla.

A mi hermano, a quien quiero que cada logro sea motivo de inspiración y prueba de que es posible superarse, y la importancia de seguirse preparando profesionalmente.

A mis abuelos paternos y a mi abuelita materna, por su amor incondicional y su apoyo. Han sido parte fundamental y mi inspiración para aspirar a seguirme formando como profesional.

A Kevin, mi novio, quien con paciencia y amor ha sido mi apoyo incondicional, quien en tiempos de desaire ha sabido animarme y recordarme de lo que soy capaz de lograr, gracias por ser mi ejemplo de perseverancia.

Mery Vanessa Calazación Satiaca

Agradecimientos

Agradezco principalmente a Dios, por darme la bendición de tener a mis padres con salud y permitirme culminar un objetivo más, que en algún momento fue solo un sueño, gracias por la fortaleza y la sabiduría dada ante las situaciones que se presentaron para lograr este objetivo. Agradezco a la Universidad Estatal de Milagro y al programa de Maestría en Biotecnología, por haberme brindado una excelente formación académica. Mi paso por este programa me ha permitido conocer a docentes que han contribuido de manera significativa en mi formación.

A mi tutor de tesis, Cruz Darío, por haberme brindado su apoyo, tiempo y compartido sus conocimientos, que han sido parte fundamental para el desarrollo de este proyecto de titulación.

Agradezco a la empresa EcocycleBiotech, por la oportunidad brindada y la confianza depositada en mí para el desarrollo de este proyecto que permitirá desarrollar innovación en sus productos. A su equipo de trabajo, quienes me brindaron su apoyo, supieron guiarme en cada obstáculo, además de animarme durante el tiempo que pude compartir con ellos, en especial a Mabel, en quien encontré una amistad.

Agradezco a mi amigo Alejandro y a su familia, por apoyarme y recibirme en su casa en los momentos que necesitaba, al igual que a la Sra. Nelly y su familia, quienes estuvieron al pendiente de mí y me brindaron su apoyo.

Finalmente, agradezco eternamente a mis padres, por su esfuerzo y todo el apoyo que me han brindado durante este tiempo, gracias a ustedes este logro es posible. A mi novio, gracias por el apoyo a la distancia y por creer en mí.

Mery Vanessa Calazacón Satiaca

Resumen

La agricultura sostenible busca satisfacer las demandas alimentarias actuales sin comprometer los recursos naturales ni la capacidad productiva de las generaciones futuras. En este contexto, los bioinsumos agrícolas, basados en microorganismos benéficos como *Bacillus velezensis*, emergen como alternativas viables para reducir la dependencia de agroquímicos sintéticos. No obstante, uno de los principales desafíos en la formulación de bioinsumos es garantizar la viabilidad y estabilidad de los microorganismos durante el almacenamiento. La microencapsulación con biopolímeros como el alginato de sodio y el almidón se presenta como una estrategia eficaz para proteger las células bacterianas y prolongar su vida útil.

El objetivo de la presente investigación fue optimizar la microencapsulación de *Bacillus velezensis* mediante la variación de la concentración de alginato de sodio (1% y 1.5%) en combinación con almidón al 0.5%, determinando la formulación que garantice la mayor viabilidad y estabilidad para su uso en bioinsumos agrícolas. Se empleó la técnica de gelación iónica con extrusión, utilizando lactato de calcio como agente gelificante. Se evaluó la eficiencia de encapsulación a las 24 horas post-microencapsulación, la viabilidad durante 30 días de almacenamiento (7, 14, 21 y 30 días), y la cinética de viabilidad mediante el modelo de Weibull.

Ambas formulaciones presentaron eficiencias de encapsulación superiores al 95%: T1 (alginato al 1%) alcanzó $96.49 \pm 6.01\%$ y T2 (alginato al 1.5%) $101.70 \pm 5.43\%$. La viabilidad se mantuvo en niveles elevados (>9.5 Log UFC/g) durante los 30 días, sin diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA $p > 0.05$). La cinética de viabilidad, evaluada mediante el modelo de Weibull, mostró parámetros de forma $\beta > 1$ para ambos tratamientos (3.016 para T1 y 1.935 para T2), indicando una curva de supervivencia con concavidad hacia abajo, y tiempos de escala (α) de 52.43 días para T1 y 47.16 días para T2. El análisis estadístico (prueba t de Student y ANOVA bifactorial) no evidenció diferencias significativas entre las formulaciones ($p > 0.05$) en ninguna de las variables evaluadas.

Se concluye que ambas concentraciones de alginato de sodio son igualmente efectivas para la microencapsulación de *Bacillus velezensis*, manteniendo la viabilidad bacteriana durante al menos 30 días. La selección de la concentración puede basarse en criterios económicos sin comprometer la calidad del bioinsumo.

Palabras clave: Viabilidad bacteriana, cinética de supervivencia, gelación iónica, matriz polimérica, estabilidad durante el almacenamiento.

Abstract

Sustainable agriculture seeks to meet current food demands without compromising natural resources or the productive capacity of future generations. In this context, agricultural bioinputs based on beneficial microorganisms such as *Bacillus velezensis* emerge as viable alternatives to reduce dependence on synthetic agrochemicals. However, one of the main challenges in bioinput formulation is ensuring the viability and stability of microorganisms during storage. Microencapsulation with biopolymers such as sodium alginate and starch presents an effective strategy to protect bacterial cells and extend their shelf life.

The aim of this research was to optimize the microencapsulation of *Bacillus velezensis* by varying the concentration of sodium alginate (1% and 1.5%) in combination with 0.5% starch, determining the formulation that ensures the highest viability and stability for use in agricultural bioinputs. The ionic gelation technique with extrusion was employed, using calcium lactate as a gelling agent. Encapsulation efficiency was evaluated at 24 hours post-microencapsulation, viability during 30 days of storage (7, 14, 21, and 30 days), and viability kinetics using the Weibull model.

Both formulations presented encapsulation efficiencies above 95%: T1 (1% alginate) reached $96.49 \pm 6.01\%$, and T2 (1.5% alginate) reached $101.70 \pm 5.43\%$. Viability remained at high levels (>9.5 Log CFU/g) throughout the 30 days, with no significant differences between treatments (ANOVA $p > 0.05$). Viability kinetics, evaluated using the Weibull model, showed shape parameters $\beta > 1$ for both treatments (3.016 for T1 and 1.935 for T2), indicating a downward concavity survival curve, and scale parameters (α) of 52.43 days for T1 and 47.16 days for T2. Statistical analysis (Student's t-test and two-way ANOVA) did not show significant differences between formulations ($p > 0.05$) in any of the evaluated variables.

It is concluded that both sodium alginate concentrations are equally effective for the microencapsulation of *Bacillus velezensis*, maintaining bacterial viability for at least 30 days. The concentration selection may be based on economic criteria without compromising the quality of the bioinput.

Keywords: *Bacillus velezensis*, microencapsulation, sodium alginate, viability, viability kinetics, agricultural bioinputs.

Lista de Figuras

Figura 1 Tinción de Gram para <i>Bacillus velezensis</i>	58
Figura 2 Prueba de catalasa para <i>Bacillus velezensis</i>	58
Figura 3 Eficiencia de encapsulación (%) de <i>Bacillus velezensis</i> , a las 24 horas post-microencapsulación.....	62
Figura 4 Viabilidad y Estabilidad de <i>Bacillus velezensis</i> microencapsulado, durante su almacenamiento en períodos de 7, 14, 21 y 30 Días.....	65
Figura 5 Viabilidad de <i>Bacillus velezensis</i> microencapsulado durante el almacenamiento (distribución de Log UFC/g por tiempo y tratamiento).....	67
Figura 6 Evolución de la viabilidad de <i>Bacillus velezensis</i> microencapsulado	70
Figura 7 Cinética de viabilidad de <i>Bacillus velezensis</i> - Modelo de Weibull.....	74

Lista de Tablas

Tabla 1 <i>Declaración de variables y operacionalización</i>	24
Tabla 2 <i>Factores y niveles del diseño experimental</i>	56
Tabla 3 <i>Rango de diámetro de las microcápsulas de Bacillus velezensis</i>	59
Tabla 4 <i>Concentración inicial de Bacillus velezensis previo a su microencapsulación</i>	59
Tabla 5 <i>Estabilización de pH de Ferticillus S con citrato de sodio</i>	60
Tabla 6 <i>Eficiencia de encapsulación (%) de Bacillus velezensis, a las 24 horas post-microencapsulación</i>	62
Tabla 7 <i>Resumen estadístico de la eficiencia de encapsulación</i>	63
Tabla 8 <i>Pruebas de normalidad, homogeneidad de varianzas y comparación de medias para la eficiencia de encapsulación</i>	64
Tabla 9 <i>Viabilidad y Estabilidad de Bacillus velezensis microencapsulado, durante su almacenamiento (expresado en % EE relativo al día 0)</i>	65
Tabla 10 <i>Viabilidad de Bacillus velezensis microencapsulado expresada en Log UFC/g durante el almacenamiento</i>	66
Tabla 11 <i>Pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) para la viabilidad de Bacillus velezensis microencapsulado</i>	67
Tabla 12 <i>Análisis de varianza bifactorial para la viabilidad de Bacillus velezensis microencapsulado</i>	68
Tabla 13 <i>Datos de viabilidad de Bacillus velezensis microencapsulado expresados en Log UFC/g durante el almacenamiento</i>	69
Tabla 14 <i>Parámetros cinéticos del modelo de Weibull para la viabilidad de Bacillus velezensis microencapsulado</i>	73

Índice / Sumario

Derechos de Autor	II
Aprobación del Tutor del Trabajo de Titulación	III
ACTA DE CALIFICACIÓN	IV
Dedicatoria	V
Agradecimientos	VI
Resumen	VII
Abstract	IX
Lista de Figuras	XI
Lista de Tablas	XII
Introducción	16
CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación	20
1.1. Planteamiento del problema	20
1.2. Delimitación del problema	21
1.3. Formulación del problema	21
1.4. Preguntas de investigación	22
1.5. Objetivos	22
1.5.1. Objetivo general	22
1.5.2. Objetivos específicos	22
1.6. Hipótesis	22
1.7. Justificación	22
1.8. Declaración de las variables (Operacionalización)	24
CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial	26
2.1. Antecedentes Referenciales	26
2.2. Marco Conceptual	27
2.2.1. Bioinsumos agrícolas	27
2.2.2. Microencapsulación	27
2.2.3. Eficiencia de encapsulación	27
2.2.4. Viabilidad microbiana	28
2.2.5. Agentes encapsulantes	28
2.2.6. Liberación controlada	28
2.2.7. <i>Bacillus velezensis</i> como agente biocontrolador	29
2.3. Marco Teórico	29
2.3.1. <i>Bioinsumos agrícolas</i>	29
2.3.1.1. Evolución histórica de los bioinsumos agrícolas.	29
2.3.1.2. Impacto ambiental de los agroquímicos sintéticos.	30
2.3.1.3. Agricultura sostenible y economía circular.	31
2.3.1.4. Regulación y normativas de bioinsumos.	31

2.3.1.5.	Factores que afectan la eficacia de bioinsumos.	32
2.3.1.6.	Interacción microorganismo-planta-suelo.	33
2.3.1.7.	Características técnicas de los bioinsumos.	33
2.3.1.8.	Clasificación y aplicaciones agrícolas.	34
2.3.2.	<i>Limitaciones actuales de los bioinsumos agrícolas</i>	35
2.3.3.	<i>Biotecnología aplicada a bioinsumos</i>	35
2.3.3.1.	Fundamentos biotecnológicos.	35
2.3.3.2.	Técnicas de formulación de bioinsumos.	36
2.3.3.3.	Microencapsulación de microorganismos.	36
2.3.3.4.	Métodos de microencapsulación.	37
2.3.3.4.1.	<i>Técnica de extrusión.</i>	38
2.3.3.5.	Polímeros utilizados en la microencapsulación.	40
2.3.3.5.1.	<i>Alginato de sodio.</i>	40
2.3.3.5.2.	<i>Almidón.</i>	42
2.3.3.5.3.	<i>Combinación de alginato y almidón.</i>	42
2.3.3.5.4.	<i>Otros biopolímeros utilizados en microencapsulación.</i>	43
2.3.4.	<i>Microorganismos de interés agrícola</i>	43
2.3.4.1.	Género <i>Bacillus</i>	43
2.3.4.2.	<i>Bacillus velezensis</i>	45
2.3.5.	<i>Aplicación de la microencapsulación en bioinsumos y sus beneficios</i> ...	46
2.3.5.1.	Cinética de liberación y modelos matemáticos.	47
2.3.6.	<i>Potencial de mercado de los bioinsumos</i>	48
CAPÍTULO III: Diseño Metodológico		50
3.1.	Tipo y diseño de investigación	50
3.2.	La población y la muestra	50
3.3.	Los métodos y las técnicas	51
3.3.1.	Caracterización fenotípica de <i>Bacillus velezensis</i>	51
3.3.2.	<i>Microencapsulación de Bacillus velezensis</i>	52
3.3.2.1.	Preparación del Agente Encapsulante y Gelificante.	52
3.3.2.2.	Formación de Microcápsulas por la Técnica de Gelación Iónica y el Método de Extrusión.....	53
3.3.2.3.	Elaboración de la Base del Producto Final	54
3.3.3.	<i>Evaluación de la Eficiencia de Encapsulación de Bacillus velezensis</i>	54
3.3.4.	<i>Evaluación de la Viabilidad y Estabilidad Temporal de Bacillus velezensis</i>	55
3.3.4.1.	Determinación de la cinética de viabilidad de <i>Bacillus velezensis</i> microencapsulado.....	56
3.4.	Procesamiento Estadístico de la Información	56
CAPÍTULO IV: Análisis e Interpretación de Resultados		58
4.1.	Análisis e Interpretación de Resultados	58
4.1.1.	<i>Caracterización fenotípica de Bacillus velezensis</i>	58

4.1.2.	Microencapsulación de <i>Bacillus velezensis</i>	58
4.1.2.1.	Características morfológicas de las microcápsulas	58
4.1.2.2.	Concentración inicial de <i>B. velezensis</i> en la matriz polimérica previa a la microencapsulación.	59
4.1.2.2.1.	Estabilización del pH de <i>Bacillus velezensis</i> con citrato de sodio	60
4.1.1.1.	Eficiencia de encapsulación de las formulaciones.	61
4.1.1.2.	Viabilidad y Estabilidad de <i>B. velezensis</i> microencapsulado.	64
CAPÍTULO V: Discusión, Conclusiones y Recomendaciones		75
5.1.	Discusión	75
5.1.1.	Caracterización fenotípica de <i>Bacillus velezensis</i>	75
5.1.2.	Microencapsulación de <i>Bacillus velezensis</i>	75
5.1.2.1.	Medición del diámetro de las microcápsulas.....	75
5.1.2.2.	Estabilización del pH y concentración inicial.	75
5.1.2.3.	Eficiencia de encapsulación.....	76
5.1.2.4.	Viabilidad y estabilidad durante el almacenamiento.....	77
5.1.2.5.	Cinética de viabilidad.	78
5.2.	Conclusiones	79
5.3.	Recomendaciones	81
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		83
Anexos		92
Anexo A. Registro fotográfico de las microcápsulas obtenidas para los dos tratamientos.		92

Introducción

Durante las últimas décadas, el uso intensivo de fertilizantes y pesticidas químicos ha contribuido considerablemente al aumento del rendimiento agrícola; sin embargo, también ha provocado efectos negativos sobre los ecosistemas, incluyendo contaminación de suelos y fuentes hídricas, degradación de la microbiota edáfica y pérdida de biodiversidad microbiana. Además de, afectar la fertilidad del suelo y, por ende, la sostenibilidad agrícola (Cabrera-Verdezoto et al., 2023). Por ello, frente a esta problemática, los bioinsumos agrícolas se han planteado como alternativas sostenibles orientadas a reducir la dependencia de agroquímicos y promover una agricultura más amigable con el ambiente.

Los bioinsumos agrícolas son productos formulados a partir de una base biológica, como microorganismos, extractos biológicos o metabolitos capaces de favorecer el crecimiento vegetal, mejorar la fertilidad del suelo y contribuir al control biológico de enfermedades agrícolas. Dentro de los microorganismos benéficos destacan las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), las cuales participan en procesos de fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de fitohormonas y antagonismo frente a fitopatógenos. Entre las especies de mayor interés biotecnológico se encuentra *Bacillus velezensis*, esta bacteria ha sido ampliamente estudiada debido a su capacidad para producir compuestos antimicrobianos y promover el desarrollo vegetal mediante distintos mecanismos fisiológicos y bioquímicos (Crespo-Avila, 2025).

Bacillus velezensis pertenece al complejo *Bacillus subtilis* y se caracteriza por su capacidad de sintetizar metabolitos secundarios con actividad antifúngica y antibacteriana, como lipopéptidos cíclicos (bacilibactina, bacilomicina-D, fengicinas y surfactinas) y policétidos (macrolactina, bacilaneos y difficidina). Asimismo, esta bacteria posee la capacidad para inducir resistencia sistémica en las plantas y mejorar la absorción de nutrientes, convirtiéndose en un microorganismo con alto potencial para el desarrollo de biofertilizantes y biopesticidas (Rabbee et al., 2019). Debido a estas características, *B. velezensis* se ha vuelto objeto de estudio en investigaciones orientadas a la formulación de bioinsumos agrícolas más eficientes y sostenibles.

A pesar de las ventajas asociadas al uso de microorganismos benéficos en agricultura, uno de los principales problemas en la elaboración de bioinsumos microbianos es la pérdida de viabilidad celular durante el almacenamiento y aplicación en campo, ya que se expone a factores ambientales que pueden afectar negativamente la supervivencia bacteriana, reduciendo la eficacia biológica del producto y limitando su estabilidad (Viera-Arroyo, 2020). Esta situación representa uno de los principales desafíos para la producción y aplicación de bioinsumos microbianos a escala agrícola.

En respuesta a esta problemática, la microencapsulación ha surgido como una herramienta biotecnológica prometedora para proteger microorganismos y mejorar la estabilidad de formulaciones microbianas. La microencapsulación es un procedimiento que consiste en encapsular células bacterianas dentro de matrices poliméricas biodegradables capaces de actuar como barreras físicas frente a condiciones ambientales adversas, permitiendo además una liberación gradual y controlada de los microorganismos en el ambiente. Esta técnica ha demostrado mejorar la viabilidad bacteriana, prolongar la vida útil de los bioinsumos y favorecer la persistencia de los microorganismos en el suelo (Szpicer et al., 2025).

Entre los agentes encapsulantes más utilizados, el alginato de sodio constituye uno de los biopolímeros más empleados debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad y capacidad de formar hidrogeles estables en presencia de calcio. Además, la combinación del alginato con otros biopolímeros, como el almidón, mejora las propiedades estructurales y mecánicas de las microcápsulas, incrementando la eficiencia de encapsulación y la protección bacteriana (Frent et al., 2022). Convirtiendo a las matrices de alginato-almidón en sistemas con potencial aplicación en la formulación de bioinsumos agrícolas.

Diversos estudios recientes han evaluado la encapsulación de *Bacillus velezensis* utilizando matrices poliméricas basadas en alginato. Moradi Pour et al. (2022) demostraron que las formulaciones de nanocápsulas de alginato-gelatina favorecieron la supervivencia del microorganismo y mejoraron su capacidad de biocontrol en aplicaciones agrícolas. Sin embargo, aunque existen investigaciones relacionadas con la encapsulación de bacterias del

género *Bacillus*, aún existe limitada información acerca de las concentraciones óptimas de alginato de sodio para la encapsulación de *B. velezensis*, específicamente en formulaciones combinadas con almidón.

La problemática del estudio a continuación, radica en optimizar formulaciones para la microencapsulación que permitan mantener la viabilidad y estabilidad de *Bacillus velezensis* para su aplicación en bioinsumos agrícolas. La eficacia de la microencapsulación depende significativamente de factores como el tipo y concentración del biopolímero utilizado como matriz encapsulante, ya que estos parámetros influyen de manera directa sobre la protección bacteriana y estabilidad durante el almacenamiento.

Por ello, la presente investigación tiene como finalidad optimizar la microencapsulación de *Bacillus velezensis* mediante la evaluación de diferentes concentraciones de alginato de sodio combinadas con almidón al 0,5 % (p/v), con el propósito de determinar la formulación que garantice mejores condiciones de viabilidad y estabilidad bacteriana para su uso en bioinsumos agrícolas. Para ello, se formularán microcápsulas mediante técnica de extrusión empleando alginato de sodio al 1 % y 1,5 % (p/v) en una solución de Lactato de calcio 0,1M, evaluando posteriormente parámetros como eficiencia de encapsulación, viabilidad bacteriana, estabilidad temporal y cinética de viabilidad mediante recuento en placa expresado en UFC/g.

En cuanto a la metodología, la investigación corresponde a un estudio experimental de enfoque cuantitativo, en el cual se busca comparar el comportamiento de distintas formulaciones encapsulantes bajo condiciones controladas de laboratorio. Los resultados permitirán generar información científica acerca del efecto de la concentración de alginato sobre la estabilidad y funcionalidad de *B. velezensis* microencapsulado, contribuyendo al desarrollo de formulaciones biotecnológicas con potencial aplicación en la agricultura sostenible.

La presente tesis se encuentra estructurada en varios capítulos. El primer capítulo comprende el planteamiento del problema, delimitación, formulación del problema, preguntas de investigación, objetivos, hipótesis, justificación y declaración de las variables operacionales

del estudio. El segundo capítulo desarrolla los antecedentes, marco conceptual y marco teórico relacionado con bioinsumos agrícolas, microencapsulación bacteriana, biopolímeros encapsulantes y características de *Bacillus velezensis*. El tercer capítulo corresponde a la metodología experimental empleada para la formulación y evaluación de las microcápsulas. El cuarto capítulo presenta el análisis e interpretación de los resultados obtenidos. Finalmente, el quinto capítulo expone las discusiones, conclusiones y recomendaciones derivadas de la investigación.

CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación

1.1. Planteamiento del problema

Hoy en día, la agricultura enfrenta grandes desafíos relacionados con la degradación ambiental y con la sostenibilidad de los sistemas productivos, debido al uso intensivo de fertilizantes y pesticidas químicos. Dentro de la producción agrícola, se hace uso de productos químicos que son la principal fuente de contaminación del agua y afectar la fertilidad edáfica, debido a la acumulación de nitratos, fosfatos y plaguicidas (Harrison, 2002). En base a esta problemática, la necesidad del desarrollo de alternativas biotecnológicas sostenibles se ha incrementado con el paso de los años, ya que se busca aprovechar los beneficios de los microorganismos que son capaces de contribuir al crecimiento vegetal y control biológico de enfermedades.

Entre los microorganismos de interés agrícola destaca *Bacillus velezensis*, una bacteria reconocida por su capacidad para producir metabolitos antimicrobianos, que participan e influyen en el crecimiento vegetal y actúan como un agente de biocontrol frente a diversos fitopatógenos influyendo positivamente en el crecimiento vegetal (Rabbee et al., 2019). Por ello, esta especie de *Bacillus* se presenta como una potencial alternativa para su aplicación en la formulación de bioinsumos agrícolas, permitiendo proporcionar alternativas frente a los agroquímicos sintéticos.

Sin embargo, uno de los principales problemas que enfrenta el desarrollo de bioinsumos agrícolas, son la disminución de la viabilidad y estabilidad de los microorganismos durante su almacenamiento, así como factores ambientales que afectan su respuesta biológica como el pH, textura del suelo, humedad y microbiota nativa, al igual que las prácticas agronómicas que influyen en la eficacia biológica de los productos (Soria, 2026).

Bajo este contexto, diferentes investigaciones han reportado el uso de biopolímeros como el alginato de sodio para encapsular microorganismos agrícolas debido a su capacidad para formar matrices biodegradables y compatibles con sistemas biológicos. Sin embargo, la eficacia de la encapsulación bacteriana depende de la composición y concentración de los polímeros utilizados, los cuales influyen sobre la estabilidad estructural de las microcápsulas,

la viabilidad celular y la liberación del microorganismo (Bashan et al., 2014).

A pesar de los avances existente en tecnologías de encapsulación microbiana y de los estudios realizados utilizando alginato de sodio como matriz encapsulante, aún persisten vacíos de información relacionadas con el comportamiento de formulaciones específicas en combinaciones de alginato-almidón para la microencapsulación de *Bacillus velezensis*. Por lo cual se requiere la evaluación de dicha combinación en aspectos como la viabilidad bacteriana, estabilidad durante su almacenamiento y la cinética de liberación en condiciones controladas.

1.2. Delimitación del problema

La investigación se centra en la microencapsulación de *Bacillus velezensis*, microorganismos empleados para formulaciones y aplicaciones agrícolas, mediante la combinación de biopolímeros alginato-almidón, con lo cual se busca obtener protección y asegurar la estabilidad *B. velezensis* durante su almacenamiento en el producto.

1.3. Formulación del problema

La microencapsulación de microorganismos benéficos representa una alternativa favorable para mejorar la estabilidad y viabilidad y liberación controlada de bacterias utilizadas en bioinsumos agrícolas. La eficacia de la microencapsulación de bacterias depende fundamentalmente de las características y concentración del biopolímero empleado como matriz encapsulante. Estudios han demostrado la eficacia de la microencapsulación empleando alginato de sodio como matriz polimérica, sin embargo, no se ha evidenciado con precisión datos acerca de la concentración de alginato de sodio para *Bacillus velezensis* que permita mejorar la viabilidad bacteriana y mantener la estabilidad de la misma durante el almacenamiento.

Por ello, en el presente trabajo de investigación se busca evaluar las diferentes concentraciones de alginato de sodio en combinación con un porcentaje estándar de almidón, para la microencapsulación de *B. velezensis*, con la finalidad de identificar la formulación que garantice mejores condiciones de estabilidad y viabilidad en aplicaciones desde un bioinsumo agrícola.

1.4. Preguntas de investigación

¿Diferentes variantes de concentraciones de biopolímeros (alginato de sodio, combinada con un porcentaje estándar de almidón), influyen en la viabilidad y estabilidad de *Bacillus velezensis* microencapsulado en aplicaciones desde un bioinsumo agrícola?

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Optimizar la microencapsulación de *Bacillus velezensis* mediante la variación del porcentaje de alginato de sodio, determinando la concentración que garantice la mayor viabilidad y estabilidad para su uso en bioinsumos agrícolas.

1.5.2. Objetivos específicos

1. Formular microcápsulas de *B. velezensis* variando las concentraciones de alginato de sodio en combinación con un porcentaje estándar de almidón como matriz biopolimérica.
2. Determinar la viabilidad y estabilidad temporal de *B. velezensis* microencapsulado mediante la técnica de recuento en placa (UFC/g).
3. Evaluar la cinética de viabilidad de *B. velezensis* microencapsulado durante su almacenamiento, mediante el recuento en placa (Log UFC/g).

1.6. Hipótesis

Hipótesis nula (H0):

La formulación compuesta por alginato de sodio al 1.5% y almidón al 0.5% presenta mayor eficiencia de microencapsulación, viabilidad y estabilidad de *Bacillus velezensis* microencapsulado en comparación con la formulación elaborada con alginato de sodio al 1%.

Hipótesis alternativa (H1):

La formulación compuesta por alginato de sodio al 1.5% y almidón al 0.5% no presenta mayor eficiencia de microencapsulación, viabilidad y estabilidad de *Bacillus velezensis* microencapsulado en comparación con la formulación elaborada con alginato de sodio al 1%.

1.7. Justificación

La creciente preocupación por los impactos ambientales derivados del uso excesivo

de agroquímicos ha impulsado la búsqueda de alternativas sostenibles orientadas a mejorar la productividad agrícola sin comprometer la calidad ambiental. Por ello, los bioinsumos agrícolas elaborados a partir de microorganismos benéficos representan una estrategia biotecnológica con gran potencial para favorecer el desarrollo de sistemas agrícolas sostenibles y reducir la dependencia de fertilizantes y pesticidas sintéticos (Aramendis et al., 2023).

Entre los microorganismos de interés agrícola, *Bacillus velezensis* destaca su capacidad para promover el crecimiento vegetal mediante compuestos bioactivos y actuar como un agente de biocontrol para inhibir la actividad de microorganismos patógenos (Zhong et al., 2024). Además de, ser capaz de crecer en condiciones ambientales que incluye temperaturas de 30-35 °C, un pH que varía de entre 5 a 10 y con una salinidad óptima de 0-0.5 M NaCl (Wekesa et al., 2022).

Sin embargo, la eficacia de los bioinsumos microbianos depende en gran medida de la capacidad de los microorganismos para mantenerse viables durante el almacenamiento y después de su aplicación en campo. La exposición a factores ambientales adversos puede reducir significativamente la supervivencia bacteriana, limitando la estabilidad y funcionalidad del producto biológico. Debido a ello, surge la necesidad del desarrollo de estrategias que permitan proteger las células microbianas y mejorar su persistencia en condiciones agrícolas (Bashan et al., 2014).

La microencapsulación constituye una herramienta biotecnológica innovadora que permite proteger microorganismos mediante el uso de matrices poliméricas biodegradables capaces de conservar la viabilidad celular y favorecer la liberación gradual del microorganismo. El alginato de sodio es uno de los biopolímeros más utilizados en procesos de encapsulación gracias a sus características de biocompatibilidad. Asimismo, la combinación con polisacáridos naturales como el almidón, contribuye con la mejora de las propiedades mecánicas y estructurales de las microcápsulas, favoreciendo la estabilidad bacteriana y aumentando la eficiencia de encapsulación (Wang et al., 2022).

La presente investigación posee relevancia científica debido a que permitirá generar

información acerca del efecto de diferentes concentraciones de alginato de sodio sobre la viabilidad, estabilidad y cinética de liberación de *Bacillus velezensis* microencapsulado. Los resultados contribuirán al desarrollo de formulaciones microbianas encapsuladas aplicables en bioinsumos agrícolas.

Desde el punto de vista ambiental, el uso de bioinsumos contribuye a disminuir el uso de agroquímicos sintéticos y reducir los efectos negativos asociados a la contaminación y degradación del suelo. Además, la aplicación de tecnologías como la microencapsulación favorece el desarrollo de tecnologías biotecnológicas sostenibles compatibles con la conservación de los recursos naturales y protección contra la degradación del compuesto activo (Alonso Alonso, 2011).

1.8. Declaración de las variables (Operacionalización)

Variable independiente:

- Concentración de alginato de sodio (% p/v).

Variables dependientes:

- Eficiencia de encapsulación de *Bacillus velezensis*
- Viabilidad de *Bacillus velezensis* microencapsulado.
- Estabilidad temporal del microorganismo microencapsulado.
- Cinética de viabilidad de *B. velezensis* microencapsulado.

Tabla 1

Declaración de variables y operacionalización.

Variable	Tipo	Dimensión	Indicador	Escala de medición
Concentración de alginato de sodio	Independiente	Concentración del polímero encapsulante	% p/v	Razón continua
Eficiencia de encapsulación de <i>Bacillus velezensis</i>	Dependiente	Capacidad de retención celular durante la encapsulación	(Log N° de células encapsuladas/ Log N° células iniciales)x100%	Razón continua

Variable	Tipo	Dimensión	Indicador	Escala de medición
Viabilidad de <i>B. velezensis</i> microencapsulado	Dependiente	Viabilidad post-microencapsulación	UFC/g	Razón continua
Estabilidad temporal del microorganismo microencapsulado	Dependiente	Estabilidad en el tiempo	Días 7, 14, 21 y 30	Razón continua
Cinética de viabilidad de <i>B. velezensis</i> microencapsulado.	Dependiente	Velocidad de pérdida de viabilidad durante el almacenamiento	Parámetro de forma (β) Parámetro de escala (α) Coeficiente de determinación (R^2)	Razón continua

CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial

2.1. Antecedentes Referenciales

A nivel global, el proteger microorganismos mediante la microencapsulación ha sido ampliamente estudiada como estrategia para mejorar la estabilidad y funcionalidad de bioinsumos agrícolas. Diversas investigaciones han demostrado que la encapsulación mediante polímeros biodegradables protege a los microorganismos frente a condiciones ambientales adversas y favorece su liberación gradual, incrementando su supervivencia y eficacia biológica en aplicaciones agrícolas (Bashan et al., 2014). Asimismo, Hernández-Martínez et al. (2022) señalaron que el alginato de sodio constituye uno de los materiales más utilizados en encapsulación debido a su biocompatibilidad, capacidad gelificante y facilidad de aplicación, destacando además que su combinación con otros polisacáridos mejora las propiedades físicas de las microcápsulas y contribuye con la estabilidad microbiana.

En el Ecuador se han desarrollado investigaciones relacionadas con el uso de microorganismos benéficos en agricultura. Lucas & Llerena (2024), evaluaron biofertilizantes elaborados a partir de microorganismos promotores del crecimiento vegetal en cultivos de arroz, reportando mejoras en parámetros agronómicos y productividad, lo que evidenció el potencial de estos microorganismos como alternativas sostenibles frente al uso de fertilizantes químicos.

En relación con bacterias de interés agrícola, Rabbee et al. (2019) reportaron que *Bacillus velezensis* presenta actividad antagonista frente a diversos fitopatógenos gracias a la producción de lipopéptidos y metabolitos bioactivos, favoreciendo su uso en formulaciones biológicas para el control de enfermedades y promoción del crecimiento vegetal. De igual manera, Fira et al. (2018) indicaron que especies del género *Bacillus* poseen elevada resistencia ambiental y potencial biotecnológico para el desarrollo de biofertilizantes y biopesticidas sostenibles. En conjunto, estos antecedentes evidencian la importancia de desarrollar formulaciones microbianas estables que permitan mejorar la viabilidad y persistencia bacteriana en condiciones agrícolas.

Por los antecedentes expuestos se evidencia el interés científico y aplicativo del desarrollo de bioinsumos agrícolas basados en microencapsulación de bacterias benéficas. Por lo cual, es necesario poder contribuir con información relacionada con formulaciones específicas para la microencapsulación de bacterias como *Bacillus velezensis* utilizando matrices combinadas de alginato y almidón, especialmente en aspectos asociados a la estabilidad bacteriana, viabilidad celular y su cinética durante el almacenamiento.

2.2. Marco Conceptual

2.2.1. Bioinsumos agrícolas

Los bioinsumos agrícolas se definen como aquellos productos que tienen una base biológica, ya que son elaborados a partir de organismos vivos y sus derivados. Estos se clasifican según su función y por su naturaleza. Dependiendo de la función que cumplen, se distinguen los siguientes: biofertilizantes o biocontroladores; mientras que, según la naturaleza del bioinsumo se distinguen según el organismo ya que puede ser de macroorganismos o microorganismos, como bacterias, hongos, protozoos, entre otros (Aramendis et al., 2023).

2.2.2. Microencapsulación

La microencapsulación se define como la tecnología que permite encapsular en partículas, cuyo tamaño varían de 1µm a 100 µm, donde el compuesto activo se encuentra envuelto por una matriz polimérica. Las microcápsulas tienen la capacidad de liberar el compuesto activo de forma prolongada, al liberarse de manera gradual permite prolongar el efecto del compuesto de interés (Niño-Vásquez et al., 2022).

2.2.3. Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación (EE) permite medir la cantidad del principio activo que fue cargado en la matriz polimérica con relación a la concentración inicial utilizada durante el proceso de formulación. Además, permite determinar si la concentración del polímero empleado y la técnica de formación de la microcápsula protegen al principio activo (Suárez & Brito, 2020).

$$\%Eficiencia\ de\ encapsulación = \frac{Log\ N}{Log\ N_0} \times 100 \quad (1)$$

Donde, Log N indica el logaritmo del número de células bacterianas atrapadas en las microesferas después de la microencapsulación y Log N0 representa el logaritmo del número de células *B. velezensis* libres agregadas previo a la microencapsulación (Córdova-Pogo, 2025).

2.2.4. Viabilidad microbiana

La viabilidad, en microbiología se define como la capacidad de las células microbianas poseen para mantenerse funcionales en condiciones específicas (Córdova-Pogo, 2025).

$$\% Viabilidad = \frac{\text{Log } N_t}{\text{Log } N_0} \times 100 \quad (2)$$

Donde, Log Nt indica el logaritmo del número de células bacterianas atrapadas en las microesferas en los tiempos de análisis establecidos y Log N0 representa el logaritmo del número de células *B. velezensis* en el día 0, post-microencapsulación (Córdova-Pogo, 2025).

2.2.5. Agentes encapsulantes

Los agentes encapsulantes son materiales poliméricos de origen natural o sintético, estos tienen la capacidad de formar una película o matriz que protege al principio activo de factores ambientales, además, permiten la liberación controlada de la sustancia encapsulada. Los agentes encapsulantes se clasifican en cuatro categorías como: ceras, lípidos, proteínas, carbohidratos como el almidón y el alginato de sodio, y polímeros de grado alimenticio (Guevara-Bretón & Jiménez-Munguía, 2008).

2.2.6. Liberación controlada

La liberación controlada permite definir la disponibilidad del principio activo y el tiempo en el que dicho compuesto será liberado a una velocidad determinada. Esto puede ocurrir mediante varios métodos como: difusión, en la cual los compuestos encapsulados se desplazan desde el interior de la matriz hacia la superficie; disolución, proceso en el cual la pared del material se disuelve gracias a factores externos; hinchazón, el material absorbe el líquido circundante; erosión, disminuye el grosor del material encapsulante de manera que se degrada gradualmente, y, fractura, proceso mediante el cual el encapsulante se rompe debido a la aplicación de fuerzas externas (Cardona-Tangarife et al., 2021).

2.2.7. *Bacillus velezensis* como agente biocontrolador

Bacillus velezensis es una bacteria grampositiva (GRAM +), aerobia y tiene la capacidad de formar endosporas que promueven el crecimiento vegetal. El análisis genómico de esta especie revela que posee grupos de genes determinados, los cuales están relacionados con la biosíntesis de metabolitos secundarios, estos cumplen un papel importante en la supresión de patógenos y en la promoción del crecimiento vegetal, esto gracias a la capacidad de *B. velezensis* para sintetizar lipopéptidos cíclicos y policétidos. Además, los metabolitos secundarios que produce desencadenan resistencia sistémica en las plantas permitiendo que las plantas puedan defenderse ante microorganismos virulentos (Rabbee et al., 2019).

2.3. Marco Teórico

2.3.1. Bioinsumos agrícolas

2.3.1.1. Evolución histórica de los bioinsumos agrícolas.

Los bioinsumos agrícolas surgen como alternativa ante el uso de agroquímicos a los cuales se les atribuye grandes desventajas para el medio ambiente y la fertilidad del suelo. Históricamente, dentro de las actividades agrícolas se realizan prácticas como el uso de estiércol y compost, progresivamente estas actividades incluyeron los microorganismos beneficiosos en el suelo. La evaluación de las propiedades y beneficios de la implementación de bioinsumos, inicia con el descubrimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno, descubrimiento que dio lugar al desarrollo del primer biofertilizante, Nitragin, comercializado en 1895 por Nobbe y Hilther. Innovación seguida con la introducción de Azotogen (producto a base de *Azotobacter chroococcum*) y Phosphobactin (*Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*), productos comercializados en Rusia en el año de 1900. Para el año de 1934 inició el desarrollo de biofertilizantes de *Rhizobium*, además de la evaluación de cultivos de *Azotobacter* y fosfobacterias (Singh et al., 2025).

Un hito importante en la historia de los bioinsumos fue el descubrimiento y comercialización de *Bacillus velezensis* cepa GB03, aislada en campos de trigo australianos en 1971. Esta cepa fue posteriormente aprobada por la Agencia de Protección Ambiental de

los Estados Unidos (EPA) en 1998 para su uso comercial como Kodiak, y más tarde como BioYield, consolidándose como un modelo de bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR) (Jang et al., 2023).

2.3.1.2. Impacto ambiental de los agroquímicos sintéticos.

Dentro de los productos agroquímicos se distinguen diez grupos, como insecticidas, fungicidas, herbicidas, fitoreguladores, entre otros. El uso intensivo y prolongado de fertilizantes y pesticidas químicos en la agricultura ha desencadenado una serie de consecuencias ambientales negativas de gran relevancia. Por un lado, el exceso de estos productos genera contaminación tanto en los suelos agrícolas como en los cuerpos de agua cercanos, lo que puede provocar alteraciones en el equilibrio ecológico de los ecosistemas afectados. Además, la introducción continua de agroquímicos altera la estructura y función de los ecosistemas agrícolas, generando impactos a distintos niveles (Cid, 2014).

Estudios han evidenciado que los residuos de fertilizantes y pesticidas no solo permanecen en el ambiente durante largos periodos, sino que también pueden acumularse, afectando la salud y abundancia de organismos benéficos como insectos, lombrices y microorganismos. Esta acumulación reduce la biodiversidad microbiana del suelo, poniendo en riesgo los procesos naturales de fertilidad y resiliencia ecológica (del Puerto Rodríguez et al., 2014).

Uno de los problemas más graves asociados a la agricultura es la contaminación de fuentes hídricas con nitratos y fosfatos derivados de los fertilizantes químicos. Estos compuestos, pueden ser arrastrados por la lluvia o el riego, llegando a ríos, lagos y acuíferos, donde estimulan el crecimiento excesivo de algas, proceso conocido como eutrofización. Esta situación deteriora la calidad del agua, disminuye el oxígeno disponible y afecta de manera directa la vida acuática, comprometiendo el equilibrio de los ecosistemas afectados (Aktar et al., 2009).

Adicionalmente, la aplicación frecuente de pesticidas favorece la evolución y aparición de resistencia en los microorganismos fitopatógenos, es decir, aquellos que causan enfermedades en las plantas. Con el tiempo, estas poblaciones resistentes hacen que los

productos químicos tradicionales pierdan eficacia, obligando a los agricultores a usar dosis mayores o buscar alternativas menos sostenibles, lo que agrava aún más el problema ambiental (Fira et al., 2018).

2.3.1.3. Agricultura sostenible y economía circular.

Ante este panorama, la agricultura sostenible surge como una alternativa necesaria que busca satisfacer las necesidades alimentarias actuales sin comprometer los recursos naturales ni afectar la capacidad productiva de las generaciones futuras. Este modelo promueve prácticas agrícolas menos dependientes de insumos sintéticos y más respetuosas con el entorno ecológico (Pedreño et al., 1995). Por ello, los bioinsumos agrícolas se posicionan como herramientas fundamentales. Su uso contribuye a reducir la aplicación de agroquímicos sintéticos, protege la biodiversidad y fomenta métodos de producción compatibles con la conservación ambiental, manteniendo la productividad de los cultivos, la preservación de los recursos naturales y la salud de los ecosistemas agrícolas (Aramendis et al., 2023).

El uso de microorganismos benéficos en la agricultura representa un avance significativo hacia la sostenibilidad. Estos microorganismos tienen la capacidad de mejorar la absorción y el aprovechamiento de nutrientes esenciales, como el nitrógeno, incrementando la eficiencia de los fertilizantes y reduciendo la cantidad de insumos químicos (Viera-Arroyo, 2020). Además, los bioinsumos se encuentran ligados a los principios de la economía circular, ya que fomentan el reciclaje biológico de nutrientes dentro de los sistemas agrícolas y permiten dar valor a residuos orgánicos (González Sánchez, 2023).

2.3.1.4. Regulación y normativas de bioinsumos.

El crecimiento sostenido del mercado de bioinsumos en los últimos años ha llevado a la necesidad de establecer regulaciones específicas destinadas a asegurar la calidad microbiológica y la seguridad de estos productos biológicos. En diferentes partes del mundo, se han desarrollado normativas que exigen la identificación taxonómica precisa de los microorganismos utilizados, el control de la concentración celular, la verificación de la ausencia de contaminantes y la garantía de estabilidad durante el almacenamiento y

transporte del producto. Estas regulaciones buscan proteger tanto a los agricultores como a los consumidores, asegurando la efectividad y la inocuidad de los bioinsumos aplicados en la agricultura (Arcudia Hernández et al., 2025).

En el caso de América Latina, algunos países han logrado avances notables en la regulación de biofertilizantes y biopesticidas. Brasil y Argentina son ejemplos destacados por contar con marcos normativos robustos y en constante actualización, que abordan aspectos clave para el desarrollo seguro y eficiente de la industria de los bioinsumos (Aramendis et al., 2023).

En el Ecuador, la regulación de bioinsumos ha sido integrada dentro del marco fitosanitario y de calidad agrícola. La Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD) establece, a través del Manual Técnico para el Registro y Control de Fertilizantes, Enmiendas de Suelo y Productos Afines de Uso Agrícola (2022), los requisitos para el registro y control de estos productos. Este documento detalla especificaciones que aseguran la calidad microbiológica, la identificación taxonómica de los microorganismos y la estabilidad durante el almacenamiento, alineando la normativa ecuatoriana con estándares internacionales de calidad para bioinsumos. El manual contempla la categoría de Inoculantes Biológicos, la cual se enfoca en microorganismos solubilizadores de fósforo, activadores de crecimiento y bacterias fijadoras de nitrógeno, estableciendo los requisitos de concentración mínima de UFC y pureza microbiológica pertinentes para el desarrollo de este estudio. Es así que, la microencapsulación de *Bacillus velezensis* y su evaluación de viabilidad y estabilidad se alinean con los lineamientos establecidos por AGROCALIDAD, orientados a garantizar la calidad y eficacia de los bioinsumos comercializados en el país (AGROCALIDAD, 2022).

2.3.1.5. Factores que afectan la eficacia de bioinsumos.

La eficiencia de los bioinsumos agrícolas está determinada por una variedad de factores ambientales y microbiológicos que pueden influir directamente en la supervivencia, el desempeño y la funcionalidad de los microorganismos que contienen. Entre los elementos más relevantes que afectan su eficacia se encuentran la temperatura, la humedad, la radiación ultravioleta, el pH del suelo y la interacción con los microorganismos nativos presentes en el

entorno agrícola. Por ejemplo, las temperaturas elevadas o calor excesivo pueden afectar de manera considerable la viabilidad de las bacterias, tanto durante el almacenamiento de los productos como en el momento de su aplicación en campo. Asimismo, la exposición a la radiación ultravioleta provoca daños celulares que se traducen en una disminución de la actividad metabólica y, en consecuencia, en una menor capacidad de los microorganismos para interactuar con las plantas. Otra variable de suma importancia es la competencia microbiana en la rizosfera, que es la región del suelo en contacto directo con las raíces. Zona en la que los microorganismos inoculados deben competir con la microbiota nativa por espacio y recursos, lo que puede limitar su capacidad para establecerse y colonizar eficazmente las raíces de las plantas. Esta competencia afecta la persistencia de las bacterias introducidas y, por lo tanto, su impacto agronómico y los beneficios que aportan (Wekesa et al., 2022).

2.3.1.6. Interacción microorganismo-planta-suelo.

La interacción microorganismo-planta-suelo, responde a proceso dinámico y fundamental para el funcionamiento adecuado de los agroecosistemas. La rizosfera es una zona especialmente activa, influenciada tanto por los exudados que las raíces liberan por la intensa actividad y diversidad de microorganismos. En esta región, se desarrollan intercambios genéticos, transformación de nutrientes y gradientes de difusión. Los microorganismos presentes en esta región se denominan PGPR, bacterias que tienen la capacidad de mejorar el desarrollo de las plantas, dentro de las cuales se citan: *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcous*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium*. La aplicación de estas bacterias permite reducir las aplicaciones de agroquímicos como fertilizantes fosforados, hasta un 75%, además de, aumentar el rendimiento de producción de cultivos (Guerrero, 2021).

2.3.1.7. Características técnicas de los bioinsumos.

Los bioinsumos se caracterizan por presentar una composición biológica activa, están diseñados para mejorar el rendimiento de los cultivos y la salud del suelo. Su efectividad depende de factores como la concentración celular (UFC/g o UFC/mL), la pureza

microbiológica, la estabilidad durante el almacenamiento y la capacidad de colonización en el suelo (Mamani de Marchese & Filippone, 2018). La calidad de un bioinsumo está determinada por la viabilidad del microorganismo, la ausencia de contaminantes y la estabilidad fisicoquímica de la formulación, aspectos que deben ser verificados mediante análisis de laboratorio y controles de calidad estandarizados (AGROCALIDAD, 2022).

2.3.1.8. Clasificación y aplicaciones agrícolas.

Los bioinsumos pueden clasificarse en varias categorías según su función principal: biofertilizantes, biopesticidas, bioestimulantes y acondicionadores biológicos del suelo. Los biofertilizantes están compuestos por microorganismos capaces de fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar fósforo o facilitar la disponibilidad de nutrientes esenciales para las plantas, contribuyendo así a una nutrición vegetal más eficiente. Los biopesticidas, por su parte, incluyen bacterias, hongos y virus que se emplean para el control biológico de plagas y enfermedades causadas por organismos fitopatógenos. Los bioestimulantes son productos diseñados para activar procesos fisiológicos en las plantas, mejorando su desarrollo y su capacidad para enfrentar situaciones de estrés. Finalmente, los acondicionadores biológicos del suelo ayudan a optimizar las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo, fortaleciendo su estructura y su vida microbiana (Mamani de Marchese & Filippone, 2018).

La variedad de la parte biológica para la formulación de bioinsumos le confiere aplicaciones importantes en cultivos agrícolas debido a su capacidad para mejorar la productividad y reducir el uso de agroquímicos. Diversos estudios reportan que bacterias promotoras del crecimiento vegetal favorecen la absorción de nutrientes, incrementan la biomasa vegetal y reducen la incidencia de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos (Fira et al., 2018).

Particularmente, bacterias del género *Bacillus* han demostrado capacidad para producir sideróforos, lipopeptidos y enzimas hidrolíticas que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos. Además, algunas cepas estimulan mecanismos de resistencia sistémica en las plantas. Otra aplicación relevante de los bioinsumos corresponde a la recuperación de suelos degradados y reducción de contaminación ambiental asociada al uso

excesivo de fertilizantes químicos. En este sentido, los microorganismos benéficos contribuyen al equilibrio microbiológico del suelo y al reciclaje natural de nutrientes. Así mismo, permite la recuperación de suelos degradados y la reducción de contaminación ambiental por el uso desmesurado de productos agroquímicos (Villarreal-Delgado et al., 2018).

2.3.2. Limitaciones actuales de los bioinsumos agrícolas

Los bioinsumos agrícolas a pesar de la variedad de sus beneficios, enfrentan limitaciones como: vida útil, eficacia de los productos, escasa inversión en investigación y desarrollo de las bioformulaciones. Por ello, hoy en día se busca incluir tecnologías de fabricación, cepas microbiológicas más resistentes y procedimientos de control calidad, con la finalidad de asegurar la calidad y eficacia de los productos (Rai et al., 2023).

La variabilidad en la eficacia de los bioinsumos en condiciones de campo debido a factores ambientales, representa una de las razones más significativas para su adopción e implementación. En consecuencia, técnicas como la microencapsulación ha surgido como una tecnología prometedora frente a estas limitaciones (Calderón-Oliver & Ponce-Alquicira, 2022).

2.3.3. Biotecnología aplicada a bioinsumos

2.3.3.1. Fundamentos biotecnológicos.

La biotecnología a través de la historia ha tenido múltiples aplicaciones documentadas, entre las principales y más destacadas es la fermentación de cereales para la producción de bebidas alcohólicas, elaboración del pan utilizando levadura, producción de penicilina, entre otros. En cuanto a su aplicación en el sector agrícola, comprende el uso de organismos vivos o componentes biológicos para desarrollar productos y procesos aplicables a la producción agrícola (Ostos-Ortíz et al., 2019). En la actualidad, las herramientas biotecnológicas permiten seleccionar microorganismos benéficos con potencial agrícola y formular productos biológicos capaces de mejorar la productividad de los cultivos. La aplicación de microorganismos en agricultura requiere procesos de aislamiento, identificación, producción masiva y formulación, garantizando que las células mantengan viabilidad y estabilidad durante el almacenamiento y aplicación en campo (Rai et al., 2023).

2.3.3.2. Técnicas de formulación de bioinsumos.

La producción de microorganismos utilizados en bioinsumos agrícolas se realiza generalmente mediante procesos de fermentación en condiciones controladas. Estos procesos permiten obtener elevadas concentraciones celulares garantizando pureza microbiológica y estabilidad fisiológica. Los sistemas de fermentación pueden desarrollarse a escala laboratorio, piloto o industrial, dependiendo de los objetivos de producción. Durante este proceso se controlan parámetros como temperatura, pH, oxigenación y disponibilidad de nutrientes (Rodríguez Aristizabal & Lugo Ramírez, 2023). En el caso de *Bacillus* spp., la capacidad de formar endosporas representa una ventaja biotecnológica importante debido a que incrementa la resistencia bacteriana frente a condiciones ambientales (Villarreal-Delgado et al., 2018).

Las técnicas biotecnológicas aplicadas a bioinsumos incluyen fermentación microbiana, secado por aspersión, liofilización y encapsulación. La fermentación permite producir grandes cantidades de biomasa microbiana en condiciones controladas, mientras que los métodos de estabilización buscan preservar la viabilidad celular. La liofilización y el secado por aspersión son técnicas frecuentemente utilizadas para prolongar la vida útil de microorganismos; sin embargo, pueden afectar la viabilidad bacteriana debido al estrés térmico y osmótico generado durante el proceso (Cardona-Tangarife et al., 2021; Montoya-Arango et al., 2023).

Debido a estas limitaciones, la microencapsulación ha surgido como una alternativa prometedora para proteger bacterias benéficas y mejorar la liberación controlada de microorganismos en el ambiente agrícola.

2.3.3.3. Microencapsulación de microorganismos.

La microencapsulación es una técnica mediante la cual partículas sólidas, líquidas o microorganismos son recubiertos o atrapados dentro de matrices poliméricas semipermeables, formando microcápsulas capaces de proteger el material encapsulado frente a factores ambientales adversos (Calderón-Oliver & Ponce-Alquicira, 2022). En agricultura, esta tecnología ha adquirido importancia debido a su capacidad para mantener la viabilidad

de microorganismos utilizados en bioinsumos y facilitar su liberación controlada en el suelo (Cardona-Tangarife et al., 2021). Según Moradi Pour et al. (2022), la microencapsulación de *Bacillus velezensis* mejora significativamente la supervivencia bacteriana y favorece el control biológico de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos.

2.3.3.4. Métodos de microencapsulación.

Actualmente existen diversas técnicas utilizadas para encapsular microorganismos benéficos, entre ellas extrusión, gelificación, liofilización, emulsificación, secado por aspersión y coacervación. Cada técnica presenta ventajas y limitaciones dependiendo del tipo de microorganismo y objetivo de aplicación (MOSQUERA-VIVAS et al., 2024). Es así que, la selección del método adecuado resulta fundamental para asegurar la viabilidad celular y la eficacia del producto final.

Mosquera-Vivas et al. (2024), menciona en su artículo de revisión la definición de estos métodos:

- **Coacervación:** Esta técnica se basa en un proceso de encapsulación químico y es considerado como el verdadero proceso de encapsulación, ya que el material de revestimiento encapsula por completo al núcleo, mediante una capa continua, la cual se constituye de la formación de complejos de dos biopolímeros que poseen cargas opuestas al formar una emulsión con uno de ellos, seguidamente se introduce el segundo polímero iniciando la formación de complejos. Esta técnica proporciona una alta eficiencia de encapsulación, propiedades de liberación controlada y una mejor protección de los materiales a encapsular.
- **Gelificación iónica:** Se basa en las interacciones iónicas que ocurren entre un polímero y un polianión, esta interacción produce un gel insoluble dentro de una sustancia activa, de manera que la sustancia de interés queda atrapada en la matriz del biopolímero. Este método puede ser realizado por procesos de aspersión, extrusión o pulverización. Las cápsulas que se obtienen son formadas por la reticulación, proceso que ocurre al utilizar alginato, donde los grupos carboxilato interactúan con cationes divalentes como el calcio.

- **Emulsificación:** Perez-Palacios et al. (2022) menciona que la emulsificación permite obtener microcápsulas de tamaño reducido y elevada homogeneidad; sin embargo, requiere solventes y agentes emulsificantes que pueden afectar la viabilidad celular.
- **Secado por aspersión:** El secado por aspersión constituye una técnica ampliamente utilizada a nivel industrial debido a su rapidez y facilidad de escalamiento. No obstante, las altas temperaturas utilizadas durante el proceso pueden reducir considerablemente la supervivencia bacteriana (Wang et al., 2022).
- **Liofilización:** Esta técnica es ampliamente utilizada para la conservación de microorganismos, ya que permite eliminar el contenido de agua por sublimación, manteniendo la viabilidad celular. Sin embargo, puede generar estrés osmótico y daño en membranas celulares, lo cual reduce la supervivencia bacteriana (Cardona-Tangarife et al., 2021).
- **Extrusión:** La técnica de extrusión ha demostrado ser una de las más eficientes para encapsular bacterias sensibles debido a que se desarrolla en condiciones suaves y acuosas, evitando daños fisiológicos sobre las células microbianas (Wang et al., 2022). La microencapsulación ofrece múltiples ventajas en la formulación de bioinsumos agrícolas. Entre los principales beneficios destacan la protección de las bacterias frente a radiación UV, deshidratación y variaciones de temperatura, además de mejorar la estabilidad durante el almacenamiento. Adicionalmente, esta técnica permite la liberación gradual del microorganismo encapsulado, aumentando la persistencia bacteriana en el suelo y favoreciendo la colonización de la rizosfera (Velloso et al., 2023).

La microencapsulación también contribuye a reducir pérdidas de viabilidad durante el transporte y almacenamiento de los productos biológicos. Esto representa ventajas económicas y tecnológicas para la industria de bioinsumos (Wang et al., 2022).

2.3.3.4.1. Técnica de extrusión.

La técnica de extrusión constituye uno de los métodos más utilizados para la microencapsulación de microorganismos debido a su simplicidad, bajo costo y elevada

compatibilidad con bacterias sensibles. El proceso consiste en preparar una suspensión bacteriana mezclada con un polímero encapsulante, generalmente alginato de sodio, la cual es posteriormente goteada en una solución de calcio para formar microesferas estables mediante gelificación iónica (Velloso et al., 2023). Durante la extrusión, las gotas formadas atraviesan una aguja o boquilla y entran en contacto con cloruro de calcio, donde ocurre el entrecruzamiento del alginato y la formación de microcápsulas. Este método permite encapsular microorganismos manteniendo alta viabilidad celular (Moradi Pour et al., 2022).

La técnica de extrusión presenta ventajas importantes para la microencapsulación de microorganismos, entre las que destacan su facilidad de implementación, la ausencia de solventes tóxicos y su compatibilidad con medios acuosos, lo que la convierte en una opción particularmente adecuada para bacterias sensibles como *Bacillus velezensis*. Además, esta técnica permite un control relativamente sencillo del tamaño de las microcápsulas mediante la variación de parámetros como el diámetro de la aguja, la viscosidad de la solución polimérica y la concentración del polímero utilizado (Vieira Velloso, 2024). Esta versatilidad facilita la adaptación del proceso a diferentes requisitos de encapsulación sin comprometer la viabilidad celular, aspecto fundamental para el desarrollo de bioinsumos agrícolas estables y efectivos.

No obstante, la eficiencia de la técnica de extrusión depende de múltiples parámetros fisicoquímicos relacionados tanto con la formulación como con el proceso de encapsulación. Entre los factores más importantes se encuentran la concentración de alginato de sodio, la viscosidad de la solución, el diámetro de la aguja, la velocidad de goteo y la concentración del agente gelificante (Córdova-Pogo, 2025). La concentración de alginato, por ejemplo, influye directamente sobre la resistencia mecánica de las microcápsulas y su capacidad para proteger a las bacterias encapsuladas; concentraciones bajas pueden generar estructuras débiles y porosas que no retienen eficazmente el microorganismo, mientras que concentraciones excesivamente altas incrementan la viscosidad de la solución, dificultando la formación uniforme de las gotas (Moradi Pour et al., 2022). De manera similar, la viscosidad de la solución encapsulante afecta el tamaño de partícula y la eficiencia de encapsulación; soluciones más viscosas tienden a producir microcápsulas de mayor tamaño y pueden limitar

la difusión de nutrientes y oxígeno hacia el microorganismo encapsulado, lo que podría afectar su viabilidad a largo plazo (Szpicer et al., 2025).

Otro parámetro crítico corresponde a la concentración del cloruro de calcio, utilizado como agente gelificante en el proceso de gelación iónica. Este compuesto favorece el entrecruzamiento de las cadenas de alginato, formando hidrogeles estables que permiten atrapar eficientemente las bacterias en el interior de la matriz polimérica (Dewi et al., 2025). La concentración de calcio debe ser cuidadosamente optimizada, ya que niveles insuficientes pueden resultar en una gelificación incompleta y microcápsulas frágiles, mientras que concentraciones excesivas podrían generar estructuras demasiado rígidas que afecten la liberación controlada del microorganismo. Por lo tanto, el control preciso de estos parámetros resulta fundamental para garantizar la obtención de microcápsulas con las propiedades adecuadas de tamaño, estabilidad y capacidad de protección, asegurando así la calidad y efectividad del bioinsumo final (Ortiz-Romero et al., 2021).

2.3.3.5. Polímeros utilizados en la microencapsulación.

La selección del material polimérico es un factor determinante en la eficiencia de la microencapsulación, ya que debe proteger al microorganismo encapsulado, ser biocompatible y permitir una liberación controlada. Entre los biopolímeros más utilizados para este fin destacan el alginato de sodio y el almidón, cuyas propiedades y mecanismos de acción se describen a continuación (Guevara-Bretón & Jiménez-Munguía, 2008).

2.3.3.5.1. Alginato de sodio.

El alginato de sodio es un polisacárido aniónico natural extraído principalmente de algas pardas (*Phaeophyceae*), como *Laminaria* spp., *Macrocystis* spp. y *Ascophyllum* spp. (Frent et al., 2022; Wang et al., 2022). Cuya estructura se compone de unidades de ácido β -D-manurónico (bloques M) y ácido α -L-gulurónico (bloques G) unidos por enlaces glucosídicos β -1,4 (Wang et al., 2024).

- **Propiedades físico-químicas y mecanismo de gelificación**

El alginato de sodio se caracteriza por su capacidad de gelificación iónica en presencia de cationes divalentes, como el calcio (Ca^{2+}). Este proceso ocurre mediante el intercambio de

iones sodio (Na^+) de los bloques G con cationes Ca^{2+} , formando una estructura de reticulación conocida como "modelo de la caja de huevos" (egg-box model), que da lugar a un hidrogel tridimensional estable (Wang et al., 2024; Saberi Riseh et al., 2021).

La proporción de bloques M y G influye directamente en las propiedades del gel. Los alginatos con alto contenido de bloques G forman geles más rígidos y porosos, que mantienen su integridad por períodos más prolongados. Por el contrario, los alginatos con alto contenido de bloques M producen geles más blandos y con mayor tendencia a la desintegración. El alginato ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) desde 1983 para su uso directo en las industrias alimentaria y farmacéutica, lo que respalda su seguridad como material de encapsulación (Wang et al., 2024).

- **Ventajas y limitaciones del alginato de sodio**

El alginato de sodio presenta múltiples ventajas como material de pared para la microencapsulación de microorganismos. Destaca por su baja toxicidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad y su capacidad para formar geles en condiciones suaves que no afectan la viabilidad celular (Frent et al., 2022). Además, su estructura contiene grupos carboxilo que pueden formar enlaces de hidrógeno con mucoproteínas, lo que le confiere propiedades de bioadhesión que mejoran la permanencia del material encapsulado en el sitio de liberación. El alginato también es un material de bajo costo y amplia disponibilidad, lo que lo hace económicamente viable para aplicaciones agrícolas a gran escala (Wang et al., 2024; Frent et al., 2022).

Sin embargo, el alginato presenta limitaciones que deben ser consideradas. Los geles de alginato puro tienden a tener una estructura porosa y laxa, lo que puede resultar en una protección insuficiente del microorganismo encapsulado y en una liberación no controlada. Adicionalmente, su estabilidad mecánica es relativamente débil, y puede ser susceptible a la degradación en condiciones extremas de temperatura o pH. Para superar estas limitaciones, se han desarrollado estrategias de modificación que incluyen la combinación del alginato con otros biopolímeros, como el almidón, para mejorar las propiedades de barrera y la estabilidad de las microcápsulas (Wang et al., 2024; Moradi Pour et al., 2022).

2.3.3.5.2. Almidón.

El almidón es un polisacárido de reserva ampliamente utilizado como material auxiliar en la microencapsulación debido a sus propiedades de formación de películas, biocompatibilidad y bajo costo. En combinación con alginato de sodio, el almidón mejora la estructura de la matriz polimérica, reduciendo la porosidad del gel y aumentando su densidad (Velloso et al., 2023).

- **Mecanismo de acción en matrices de encapsulación**

La incorporación de almidón en matrices de alginato contribuye a la formación de una red polimérica más compacta, que limita la difusión de oxígeno y compuestos tóxicos hacia el microorganismo encapsulado, prolongando su viabilidad durante el almacenamiento. Además, el almidón puede actuar como un sustrato metabólico para las bacterias encapsuladas, proporcionando una fuente de carbono que mantiene su actividad metabólica durante el almacenamiento (Benítez et al., 2024).

- **Ventajas y limitaciones del almidón**

La combinación de almidón con alginato ofrece ventajas significativas en términos de viabilidad bacteriana y eficiencia de encapsulación en comparación con el uso de alginato solo. La capacidad del almidón para formar redes más compactas y su función como fuente de carbono lo convierten en un aditivo valioso para mejorar el desempeño de las microcápsulas. Sin embargo, las propiedades del almidón pueden variar según su fuente botánica y el grado de modificación, por lo que la selección del tipo adecuado debe considerar los requerimientos específicos de la aplicación (Sawatphanit et al., 2022; Moradi Pour et al., 2022).

2.3.3.5.3. Combinación de alginato y almidón.

La combinación de alginato de sodio y almidón como materiales de pared para la microencapsulación de microorganismos ha sido ampliamente estudiada y ha demostrado resultados superiores en términos de viabilidad bacteriana y estabilidad durante el almacenamiento (Moradi Pour et al., 2022). El alginato proporciona la estructura de gel mediante gelificación iónica con calcio, mientras que el almidón actúa como un material de

relleno que modifica la estructura de la matriz, contribuyendo con la reducción de la porosidad y aumentando su densidad (Wang et al., 2024; Velloso et al., 2023). Esto permite obtener microcápsulas con una barrera física más efectiva y una liberación gradual del microorganismo encapsulado, aspectos que resultan fundamentales para el desarrollo de bioinsumos agrícolas estables y efectivos (Saberri Riseh et al., 2021; Moradi Pour et al., 2022).

2.3.3.5.4. Otros biopolímeros utilizados en microencapsulación.

Además del alginato y el almidón, otros biopolímeros han sido empleados para la microencapsulación de microorganismos, ya sea como materiales de pared principales o como modificadores de matrices poliméricas. Entre ellos se incluyen la pectina, la goma arábiga, el quitosano, la carragenina, las gomas naturales y las proteínas, como el aislado de proteína de suero de leche (Wang et al., 2024). Estos materiales ofrecen propiedades complementarias que pueden mejorar la estabilidad mecánica, la resistencia a factores ambientales y la cinética de liberación de los microorganismos encapsulados (Wang et al., 2024). La combinación de múltiples biopolímeros en sistemas de encapsulación multicapa ha mostrado un desempeño superior en términos de viabilidad y liberación controlada, lo que constituye un área activa de investigación en el desarrollo de bioinsumos agrícolas (Saberri Riseh et al., 2021; Wang et al., 2024).

2.3.4. Microorganismos de interés agrícola

2.3.4.1. Género *Bacillus*.

De acuerdo con Rabbee et al. (2019) las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* constituyen uno de los grupos microbianos más estudiados y utilizados en agricultura debido a su capacidad para sobrevivir en condiciones ambientales adversas y producir múltiples metabolitos de interés agrícola. Estas bacterias son Gram positivas, aerobias o anaerobias facultativas y poseen la capacidad de formar endosporas resistentes al calor, desecación, radiación ultravioleta y estrés osmótico. La formación de endosporas representa una ventaja biotecnológica importante para la formulación de bioinsumos debido a que incrementa la estabilidad y vida útil de los productos microbianos.

Las especies del género *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes ambientes, especialmente en el suelo y la rizosfera, donde participan activamente en procesos biológicos relacionados con reciclaje de nutrientes, degradación de materia orgánica y protección vegetal. Su capacidad de colonizar raíces les permite establecer relaciones beneficiosas con las plantas, favoreciendo la absorción de nutrientes y estimulando el crecimiento vegetal (Villarreal-Delgado et al., 2018).

Dentro de los mecanismos de acción de *Bacillus* spp. destacan la producción de metabolitos antimicrobianos, competencia por nutrientes y espacio ecológico, síntesis de enzimas hidrolíticas y activación de mecanismos de resistencia sistémica inducida en las plantas. Estas bacterias producen compuestos como surfactinas, fengicinas e iturinas capaces de alterar membranas celulares de hongos fitopatógenos y reducir significativamente el desarrollo de enfermedades agrícolas (Fira et al., 2018).

Asimismo, diversas especies de *Bacillus* presentan capacidad para producir sideróforos, moléculas quelantes de hierro que limitan la disponibilidad de este elemento para microorganismos patógenos. Este mecanismo contribuye al control biológico y favorece simultáneamente la nutrición vegetal. Al igual que, su capacidad para producir fitohormonas como ácido indolacético (AIA), giberelinas y citoquininas, las cuales estimulan el desarrollo radicular y favorecen el crecimiento vegetal. Además, algunas cepas poseen capacidad de solubilizar fósforo y facilitar la disponibilidad de nutrientes esenciales para las plantas (Villarreal-Delgado et al., 2018).

La capacidad de formar biopelículas sobre la superficie radicular constituye otro mecanismo importante asociado a la persistencia de *Bacillus* spp. en la rizosfera. Las biopelículas permiten mejorar la adhesión bacteriana, aumentar la resistencia frente a estrés ambiental y favorecer la colonización estable de las raíces (Loera-Muro & Caamal-Chan, 2023).

Desde el punto de vista biotecnológico, las bacterias del género *Bacillus* son consideradas microorganismos ideales para formulaciones agrícolas debido a su elevada estabilidad fisiológica y facilidad de producción a escala industrial. Estas características han

impulsado el desarrollo de biofertilizantes, biopesticidas y bioestimulantes formulados con cepas pertenecientes a este género bacteriano (Villarreal-Delgado et al., 2018).

2.3.4.2. *Bacillus velezensis*.

Bacillus velezensis pertenece al complejo *Bacillus subtilis* y actualmente es considerado uno de los microorganismos más promisorios para aplicaciones agrícolas sostenibles debido a su capacidad de promover el crecimiento vegetal y ejercer control biológico frente a diversos fitopatógenos. Esta bacteria ha despertado gran interés científico debido a la elevada diversidad de metabolitos secundarios que produce y a su adaptabilidad frente a diferentes condiciones ambientales (Fira et al., 2018).

Entre los metabolitos más importantes sintetizados por *Bacillus velezensis* destacan surfactinas, iturinas y fengicinas, compuestos pertenecientes al grupo de los lipopeptidos cíclicos. Estos metabolitos presentan potente actividad antifúngica debido a que alteran la permeabilidad de membranas celulares de hongos fitopatógenos, provocando lisis celular e inhibición del crecimiento micelial (Rabbee et al., 2019). Diversas investigaciones reportan que *Bacillus velezensis* posee actividad antagonista frente a hongos como *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum spp*, *Fusarium spp* y *Rhizoctonia solani*, patógenos responsables de importantes pérdidas económicas en cultivos agrícolas. Además de su actividad antimicrobiana, *Bacillus velezensis* puede actuar como bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR) mediante mecanismos relacionados con producción de fitohormonas, fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fósforo y síntesis de sideróforos. Estas características favorecen el desarrollo vegetal y mejoran la eficiencia nutricional de los cultivos (Zhong et al., 2024).

La colonización eficiente de la rizosfera representa otro aspecto importante de *Bacillus velezensis*. Esta bacteria posee capacidad para formar biopelículas y adherirse a superficies radiculares, permitiendo una interacción estable con la planta y aumentando la persistencia del microorganismo en el suelo (Loera-Muro & Caamal-Chan, 2023). La resistencia ambiental de *Bacillus velezensis* constituye una ventaja importante para su aplicación en bioinsumos agrícolas. La formación de endosporas le permite tolerar condiciones extremas de

temperatura, desecación y estrés osmótico, facilitando su formulación y almacenamiento en productos biológicos comerciales (Fira et al., 2018). En los últimos años, la microencapsulación de *Bacillus velezensis* ha adquirido gran interés debido a que permite incrementar la estabilidad y viabilidad bacteriana durante el almacenamiento y aplicación agrícola. Diversos estudios han demostrado que el uso de matrices poliméricas basadas en alginato mejora la protección celular y favorece la liberación gradual del microorganismo en el suelo. Asimismo, investigaciones recientes indican que la encapsulación de *Bacillus velezensis* mejora significativamente la persistencia bacteriana en la rizosfera y aumenta la eficacia de control biológico frente a enfermedades causadas por hongos fitopatógenos (Moradi Pour et al., 2022).

2.3.5. Aplicación de la microencapsulación en bioinsumos y sus beneficios

La microencapsulación de microorganismos benéficos representa una estrategia biotecnológica orientada a mejorar la estabilidad, supervivencia y eficiencia de bioinsumos agrícolas. Esta técnica permite proteger bacterias sensibles frente a factores ambientales adversos como radiación ultravioleta, oxidación, cambios de temperatura y deshidratación. Las microcápsulas funcionan como barreras físicas semipermeables capaces de proteger los microorganismos encapsulados y favorecer su liberación controlada en el ambiente agrícola. Esto resulta particularmente importante para mantener la viabilidad bacteriana durante almacenamiento y transporte (Calderón-Oliver & Ponce-Alquicira, 2022). Diversos estudios reportan que la encapsulación incrementa significativamente la persistencia de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la rizosfera, mejorando su capacidad de colonización radicular y eficacia agronómica (Moradi Pour et al., 2022).

La aplicación de microorganismos encapsulados en biofertilizantes permite mejorar la disponibilidad de nutrientes y prolongar la actividad microbiana en el suelo. Asimismo, en biopesticidas, la encapsulación favorece el control biológico debido a que incrementa la supervivencia de bacterias antagonistas frente a fitopatógenos (Aramendis et al., 2023). La técnica de extrusión utilizando alginato de sodio constituye uno de los métodos más empleados para encapsular bacterias agrícolas debido a su bajo costo, facilidad de aplicación

y elevada compatibilidad con microorganismos vivos. Además, esta técnica permite formar microcápsulas homogéneas y biodegradables en medios acuosos (MOSQUERA-VIVAS et al., 2024).

Otro aspecto importante corresponde a la capacidad de las matrices encapsulantes para controlar la cinética de liberación bacteriana. Las formulaciones elaboradas con alginato y almidón permiten una liberación gradual de células viables favoreciendo la persistencia del microorganismo en el suelo (Wang et al., 2022).

2.3.5.1. Cinética de liberación y modelos matemáticos.

La cinética de liberación de microorganismos encapsulados puede ser descrita mediante modelos matemáticos que permiten predecir la tasa de liberación y la vida media del microorganismo en diferentes sustratos. En microbiología predictiva, estos modelos se clasifican en primarios, secundarios y terciarios. Los modelos primarios describen la población microbiana en función del tiempo, siendo los más relevantes para la cinética de liberación (Baranyi et al., 2024).

Entre los modelos más utilizados para describir curvas de inactivación y liberación microbiana se encuentran:

- **Modelo lineal (log-lineal):** Basado en la cinética de primer orden, asume una tasa de muerte constante. Aunque es el modelo más simple y tradicionalmente utilizado, su aplicación está limitada a situaciones donde la población microbiana muestra una disminución logarítmica lineal (Bevilacqua et al., 2015).
- **Modelo de Weibull:** Constituye una alternativa más flexible al modelo lineal, ya que puede describir curvas de supervivencia lineales, cóncavas y convexas mediante el parámetro de forma β . Cuando $\beta = 1$, la curva es lineal; cuando $\beta < 1$, la curva es cóncava (la tasa de muerte disminuye con el tiempo); y cuando $\beta > 1$, la curva es convexa (la tasa de muerte aumenta con el tiempo). Este modelo ha demostrado ser particularmente útil para describir la inactivación microbiana bajo diversas condiciones de estrés, incluyendo tratamientos térmicos y no térmicos. Estudios recientes confirman que el modelo de Weibull puede ser aplicado como modelo de supervivencia

microbiana en lugar del modelo lineal (Bevilacqua et al., 2015).

- **Modelo de Gompertz:** Originalmente desarrollado para describir curvas de crecimiento, su versión negativa se utiliza para modelar curvas de inactivación que presentan una fase de hombro (latencia) y una cola. Este modelo es especialmente útil cuando se observa una fase de adaptación inicial antes de que la muerte celular se acelere (Gil et al., 2011).
- **Modelo logístico y bifásico:** Estos modelos son apropiados cuando la población bacteriana presenta una distribución heterogénea de resistencia, dando lugar a curvas con diferentes fases de inactivación. El modelo bifásico, en particular, describe la inactivación como la suma de dos poblaciones con diferentes tasas de muerte, lo que refleja la heterogeneidad de la resistencia celular dentro de una población (Bevilacqua et al., 2015).

La selección del modelo más apropiado depende de la forma de la curva de supervivencia y de la naturaleza del microorganismo y del proceso de encapsulación. El modelo de Weibull ha ganado amplia aceptación en los últimos años por su simplicidad (solo dos parámetros) y su capacidad para describir una amplia variedad de curvas de supervivencia, convirtiéndose en una alternativa robusta al modelo lineal tradicional (Baranyi et al., 2024).

2.3.6. Potencial de mercado de los bioinsumos

El mercado mundial de bioinsumos agrícolas ha experimentado un crecimiento sostenido durante los últimos años debido al incremento de la demanda de sistemas productivos sostenibles y a la necesidad de reducir el uso de agroquímicos sintéticos. Actualmente, los biofertilizantes y biopesticidas representan uno de los sectores con mayor proyección dentro de la agricultura moderna (Aramendis et al., 2023). Diversos estudios señalan que la incorporación de bioinsumos puede disminuir costos de producción relacionados con fertilizantes químicos y mejorar la rentabilidad agrícola a mediano plazo. Además, estos productos contribuyen a reducir impactos ambientales asociados a la contaminación de suelos y fuentes hídricas (Alonso Alonso, 2011).

Desde el punto de vista ambiental, los bioinsumos favorecen prácticas agrícolas sostenibles debido a que mejoran la actividad biológica del suelo y disminuyen la dependencia de productos químicos sintéticos. La formulación de microorganismos encapsulados representa además una innovación tecnológica importante para la industria agrícola debido a que incrementa la estabilidad microbiológica y prolonga la vida útil de los productos comerciales (Bashan et al., 2014).

Desde una perspectiva ambiental, los bioinsumos favorecen las prácticas agrícolas sostenibles, debido a que mejoran la actividad biológica del suelo y disminuye el uso excesivo de productos químicos. La microencapsulación de microorganismos se presenta como una alternativa viable y fundamental que permite superar limitaciones asociadas a la estabilidad y viabilidad de los bioinsumos, además de presentar ventajas competitivas relacionadas con mayor viabilidad bacteriana, facilidad de almacenamiento y liberación controlada de microorganismos en el suelo. Características que favorecen la aceptación comercial y aumentan el interés industrial en tecnologías de microencapsulación aplicadas a la agricultura (Saberri Riseh et al., 2021).

CAPÍTULO III: Diseño Metodológico

3.1. Tipo y diseño de investigación

La investigación presenta un enfoque cuantitativo, ya que las variables de estudio (eficiencia de encapsulación, viabilidad en UFC/g, estabilidad temporal a los 7, 14, 21 y 30 días, y cinética de viabilidad durante su almacenamiento) son de naturaleza numérica, resultados que fueron analizados mediante métodos estadísticos. El alcance del estudio es descriptivo y explicativo: descriptivo debido a que, se caracteriza el comportamiento de *Bacillus velezensis* microencapsulado en dos formulaciones diferentes, y explicativo ya que, establece la relación entre la concentración de alginato de sodio (1% y 1,5%) en combinación con almidón 0,5% p/v y el comportamiento del microorganismo encapsulado.

El diseño de la investigación es experimental a nivel in vitro, ya que las variables independientes fueron manipuladas bajo condiciones de laboratorio. Para los tratamientos establecidos, se realizaron 6 réplicas por cada uno. Finalmente, el estudio es longitudinal prospectivo, ya que las mediciones correspondientes son realizadas en múltiples momentos (días 7, 14, 21 y 30), tiempos que permitieron evaluar viabilidad y estabilidad temporal, y la cinética de viabilidad del microorganismo microencapsulado durante su almacenamiento.

3.2. La población y la muestra

La población corresponde a bacterias del género *Bacillus* y la muestra a la especie *Bacillus velezensis*, bacteria con la cual se elabora un fungicida biológico (Ferticillus S), recurso proporcionado por la empresa ECOCYCLEBIOTECH.

El género *Bacillus* se caracteriza por sus bacterias GRAM positivas y productoras de endosporas resistentes, distribuidas ampliamente en condiciones ambientales extremas. Muchas de las especies de este género son aplicadas en la formulación de biofertilizantes, biopesticidas o bioinsecticidas debido a sus múltiples beneficios en la agricultura y su capacidad de esporulación. Al ser parte del microbioma ambiental natural, son respetuosas con el medio ambiente. Se les confiere la capacidad de resistencia a enfermedades y la mejora de la fertilidad del suelo; asimismo, poseen la capacidad de actuar como insecticidas, ya que incorporan los genes de toxinas a cultivos transgénicos, incrementando la resistencia frente a

insectos y plagas. Por ello, a estas bacterias se las engloba dentro del grupo PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* o *Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal*) por sus múltiples beneficios (Sola-Montilla, 2023).

Especies de *Bacillus*, actúan como agentes de biocontrol ante agentes patógenos. Entre estas especies, destaca *Bacillus velezensis* por su capacidad de producir metabolitos secundarios (Sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS) y sintetasas y policétidos (PKS)) que actúan contra múltiples fitopatógenos, como *Fusarium oxysporum* y *Ralstonia solanacearum* mediante lipopéptidos (Rabbee et al., 2019).

3.3. Los métodos y las técnicas

A continuación, se describen cada uno de los métodos y técnicas empleadas para la microencapsulación de *Bacillus velezensis*, bacteria empleada para el desarrollo de un fungicida biológico, Fericillus S., bioinsumo producido por la empresa ECCOCYCLEBIOTECH (ECB).

3.3.1. Caracterización fenotípica de *Bacillus velezensis*

La caracterización fenotípica de *Bacillus velezensis* se realizó mediante metodologías ya establecidas. El proceso de caracterización incluyó técnicas como la tinción de Gram y prueba de Catalasa. Para ambos procesos se utilizó un cepario de *B. velezensis*, cepario utilizado para la elaboración del pre-inóculo en un medio enriquecido, formulación propia de ECB.

- **Tinción de Gram**

Se tomó una muestra de una colonia de *B. velezensis* con ayuda de un asa de siembra, se agregó una gota de agua destilada en un portaobjetos y se extendió la muestra sobre el portaobjetos. Se fijó la muestra con ayuda de calor. Una vez fijada la muestra se agregó el cristal violeta, se dejó actuar durante 1 minuto y se enjuagó con agua destilada. Seguidamente, se agregó el Lugol y se dejó actuar durante 1 minuto, el Lugol actúa como un mordiente permitiendo fijar al cristal violeta formando un complejo insoluble. Luego, se agregó el decolorante de alcohol-acetona durante 5-10 segundos, una vez que se observó la decoloración se enjuagó con agua destilada. Finalmente, se agregó safranina, se dejó actuar

durante 1 minuto y se enjuagó. Se dejó secar la tinción y se observó en el microscopio en el lente objetivo de 40X y de 100X con ayuda de aceite de inmersión.

- **Prueba de Catalasa**

Se colocó una gota de peróxido de hidrógeno sobre un portaobjetos, se agregó una muestra de una colonia pura de *B. velezensis* con ayuda de un asa de siembra, se mezcló y se observó la reacción.

3.3.2. Microencapsulación de *Bacillus velezensis*

3.3.2.1. Preparación del Agente Encapsulante y Gelificante.

El proceso de microencapsulación inicia con la preparación de la matriz polimérica o agente encapsulante. Para ello, se desarrolló la matriz polimérica utilizando alginato de sodio en dos concentraciones (p/v): 1% y 1.5%, en combinación con el almidón en una concentración de 0.5% (p/v). Se pesó el alginato en las cantidades respectivas y se disolvió en un volumen de 70 ml de agua destilada estéril, la cual se calentó previamente, a esta mezcla se agregó el almidón. Se mezclaron los polímeros aplicando una fuerza mecánica asegurando una correcta disolución e incorporación de los mismos. Las concentraciones de alginato de sodio utilizadas en el presente estudio se establecieron en base a estudios previos que recomiendan utilizar el alginato en concentraciones de 1% al 2% (p/v) (Afzaal et al., 2022).

Para el agente gelificante se utilizó lactato de calcio en una concentración de 0.1M. Estudios demuestran que el lactato de calcio permite obtener resultados de una eficiencia de encapsulación de hasta un 99%. Un estudio realizado por Dewi et al. (2025), donde evaluó el efecto de las concentraciones de lactato de calcio para la microencapsulación de probióticos, en el cual propone concentraciones que varían entre 2-3.5 % (p/p), obteniendo una eficiencia de encapsulación de 77.93 ± 1.14 % al emplear un 3% (p/p) de lactato de calcio, porcentaje (3%) que en unidades de molaridad justifican la aplicación de la concentración del lactato de calcio utilizada para el presente estudio.

3.3.2.2. Formación de Microcápsulas por la Técnica de Gelación Iónica y el Método de Extrusión.

La técnica de gelación iónica y el método de extrusión para la formación de microcápsulas, es un método sencillo y económico, además de, evitar un daño mínimo de las células. Las microcápsulas obtenidas por este método poseen un tamaño que varía en un diámetro entre 2 a 3 mm (Ortiz-Romero et al., 2021).

- **Incorporación del Feticillus S (*Bacillus velezensis*) en la matriz polimérica**

Para la incorporación del FS en la matriz polimérica, se reguló el pH agregando citrato de sodio, permitiendo obtener un pH de entre 5 a 6 logrando la formación de las microcápsulas. La concentración del citrato de sodio a agregar varía de entre el 0.5 al 0.8% (p/v) por cada 100 ml de Feticillus S, esto en relación al pH del FS, siendo que al ser menor a 4.5 se agregó 0.8 g de citrato de sodio, mientras que al ser mayor a un pH de 4.5 se recomienda agregar 0.5 g.

Una vez que se obtiene el FS con un pH estable, se agregó 30 ml de esta solución (Feticillus S + citrato de sodio) en los 70 ml de la solución polimérica.

- **Determinación de la concentración (UFC/g) de *Bacillus velezensis* en la matriz polimérica**

Se tomó 1000µl de la solución polimérica + *B. velezensis* y se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada bufferada. Se sembró en agar PCA mediante la técnica de siembra por extensión en superficie con ayuda de un asa de Digrafsky.

Procedimiento que permitió obtener las concentraciones (3) de la bacteria agregada a la matriz polimérica previo a la microencapsulación, resultados expresados en UFC/g.

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{UFC}}{\text{g}} \right) = \frac{\text{número de colonias contadas} \times \text{factor de dilución}}{\text{volumen sembrado (ml)}} \quad (3)$$

- **Formación de las microcápsulas**

La formación de microcápsulas se realizó mediante el método de extrusión utilizando una jeringa, cuyo tamaño de aguja es de 21G. Se tomó la solución polimérica con ayuda de la jeringa, se realizó el goteo en un vaso de precipitación con lactato de calcio 0,1M (50 mL) en agitación continua a 200 rpm. Al terminar la formación de las microcápsulas, se dejó en

agitación durante 20 minutos. Una vez terminado el tiempo de agitación, se realizaron los lavados correspondientes de las microcápsulas con agua destilada estéril y se filtró al vacío, utilizando: un embudo, matraz Kitasato, papel filtro Whatman N° 1 y una bomba de vacío. Se recuperaron las microcápsulas y se almacenaron en placas Petri. Las microcápsulas se mantuvieron en refrigeración.

El diámetro de las microcápsulas fue estimado visualmente mediante el uso de una regla milimetrada, colocando las microcápsulas sobre una superficie plana y contrastando su tamaño con la escala de la regla. Se realizaron mediciones puntuales en un número representativo de microcápsulas por cada tratamiento, registrando el rango de tamaños observados.

3.3.2.3. *Elaboración de la Base del Producto Final*

- **Elaboración de la base para microcápsulas:** Se pesaron 15 g de CMC (carboximetilcelulosa), 1 g de goma xantana, además se agregaron conservantes como sorbato de potasio y benzoato de sodio. Se mezclaron en un 1L de agua, obteniendo una mezcla viscosa.
- **Elaboración de prototipos:** El producto final se elaboró utilizando una proporción de 1:10, agregando 4 gramos de microcápsulas en 40 ml de base.

3.3.3. *Evaluación de la Eficiencia de Encapsulación de *Bacillus velezensis**

La evaluación de la eficiencia de encapsulación, se realizó luego de las 24 horas de haber formado las microcápsulas. Para ello, se utilizó citrato de sodio al 2% (p/v) para poder realizar la ruptura de las microcápsulas y obtener liberación de la bacteria.

Se pesó 1 gramo de microcápsulas, se agregaron en 9 ml de citrato de sodio, se agitó con ayuda de un vórtex hasta observar la ruptura y disolución de las microcápsulas. Se realizaron diluciones seriadas en proporción 1:9 en agua peptonada bufferada, tomando 1000 µl de la bacteria contenida en el citrato de sodio. La siembra de las diluciones se realizó en Agar PCA (Plate Count Agar), mediante la técnica de siembra por extensión en superficie con ayuda de un asa de Digrafsky.

Procedimiento que permitió obtener las concentraciones de la bacteria microencapsulada aplicando la ecuación (2), resultados expresados en UFC/g. La eficiencia de encapsulación se expresó en porcentajes, aplicando la siguiente fórmula (1).

$$\%Eficiencia\ de\ encapsulación = \frac{\log N}{\log N_0} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

Log N: Logaritmo del número de células bacterianas atrapadas en las microesferas después de la microencapsulación.

Log N₀: Logaritmo del número de células *B. velezensis* libres agregadas previo a la microencapsulación.

3.3.4. Evaluación de la Viabilidad y Estabilidad Temporal de *Bacillus velezensis*

Para evaluar la viabilidad y estabilidad de las células bacterianas, se establecieron tiempos de análisis de: 7, 14, 21 y 30 días. Tiempos de análisis que permiten evaluar la supervivencia de las células y la degradación de la matriz polimérica. Además de determinar la concentración de las microcápsulas en los días establecidos, resultados que se obtuvieron mediante la técnica de recuento en placa (UFC/g).

Para ello, se recuperaron las microcápsulas contenidas en la base con ayuda de una cucharilla y se realizaron lavados con agua destilada estéril. Se pesó 1 g de microcápsulas, se agregaron en 9 ml de citrato de sodio al 2% (p/v) y se realizó la ruptura de las mismas. Se realizaron diluciones en proporción 1:9 en agua peptonada bufferada y la siembra en agar PCA, mediante la técnica de siembra por extensión en superficie.

Se empleó la ecuación del % de viabilidad (2) para la obtención de resultados.

$$\% Viabilidad = \frac{\log N_t}{\log N_0} \times 100 \quad (2)$$

Donde:

Log N_t: Logaritmo del número de células bacterianas atrapadas en las microesferas en los tiempos de análisis establecidos.

Log N₀: Logaritmo del número de células *B. velezensis* en el día 0, post-microencapsulación.

3.3.4.1. Determinación de la cinética de viabilidad de *Bacillus velezensis* microencapsulado.

A partir de los datos de viabilidad obtenidos en los tiempos de almacenamiento (7, 14, 21 y 30 días), se determinó la cinética de viabilidad de *Bacillus velezensis* microencapsulado. Para ello, los valores de UFC/g fueron transformados a $\log_{10}$ UFC/g y se ajustaron al modelo de Weibull, modelo utilizado en microbiología predictiva para describir curvas de inactivación microbiana. La aplicación de este modelo responde a que los datos experimentales mostraron un comportamiento no lineal, con una fase inicial de estabilidad seguida de una disminución progresiva de la viabilidad.

La ecuación del modelo utilizado fue:

$$\log_{10}(N_t) = \log_{10}(N_0) - \left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta \quad (4)$$

Donde:

- N_t : Concentración de bacterias viables en UFC/g en el tiempo t (días).
- N_0 : Concentración inicial de bacterias viables en UFC/g.
- α : Parámetro de escala (días).
- β : Parámetro de forma.
- t : Tiempo de almacenamiento (días).

Los parámetros α y β fueron estimados mediante una regresión no lineal, utilizando el software RStudio. La bondad de ajuste del modelo fue evaluada mediante el coeficiente de determinación (R^2).

3.4. Procesamiento Estadístico de la Información

Los datos obtenidos durante la evaluación de los tratamientos para la microencapsulación de *Bacillus velezensis* fueron registrados y organizados en hojas de cálculo de Microsoft Excel para su procesamiento y análisis. La investigación se desarrolló bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA), conformado por los siguientes factores y niveles:

Tabla 2

Factores y niveles del diseño experimental

Factor	Niveles	Descripción
Concentración de alginato de sodio (Factor A)	T1: 1% (p/v) T2: 1.5% (p/v)	Factor de estudio principal
Tiempo de almacenamiento (Factor B)	0, 7, 14, 21 y 30 días	Factor evaluado en viabilidad y cinética

Nota. Descripción del diseño experimental, número de réplicas y variable de respuesta.

El estudio se realizó con seis repeticiones por tratamiento. Los resultados obtenidos para las variables evaluadas fueron sometidos a procedimientos estadísticos que permitieron describir y comparar el comportamiento de las formulaciones estudiadas mediante el software RStudio.

Para las variables eficiencia de encapsulación (%), viabilidad y estabilidad bacteriana (UFC/g), y cinética de viabilidad, se calcularon medidas de tendencia central y dispersión, tales como media aritmética y desviación estándar. Previamente al análisis comparativo, se verificó el cumplimiento de los supuestos de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk y de homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene.

Para la eficiencia de encapsulación (%), evaluada a las 24 horas post-microencapsulación, se aplicó una prueba t de Student para muestras independientes ($p < 0.05$) para comparar los dos tratamientos.

Para la viabilidad y estabilidad durante el almacenamiento, evaluada a los 7, 14, 21 y 30 días y expresada como porcentaje de eficiencia de encapsulación relativo al día 0, se empleó un análisis de varianza bifactorial (ANOVA de dos vías), considerando como factores la concentración de alginato (2 niveles) y el tiempo de almacenamiento (5 niveles). En caso de diferencias significativas, se aplicó la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Para la cinética de viabilidad, los valores de UFC/g se transformarán a Log UFC/g y se ajustaron al modelo de Weibull. La estimación de los parámetros se realizó mediante regresión no lineal en RStudio. El coeficiente de determinación (R^2) evaluó la bondad de ajuste al modelo.

Finalmente, los resultados fueron presentados mediante tablas y gráficos estadísticos que faciliten la interpretación y discusión de los datos obtenidos.

CAPÍTULO IV: Análisis e Interpretación de Resultados

4.1. Análisis e Interpretación de Resultados

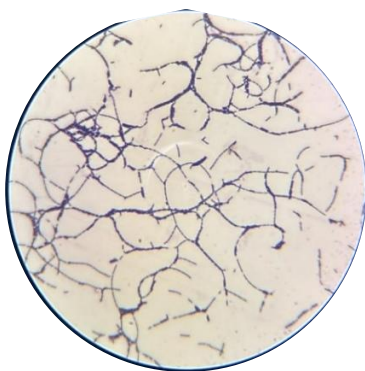
4.1.1. Caracterización fenotípica de *Bacillus velezensis*

La caracterización fenotípica de *B. velezensis*, se realizó mediante tinción de Gram y prueba de catalasa, con el fin de verificar las características fenotípicas de la cepa proporcionada por ECOCYCLEBIOTECH para los ensayos de microencapsulación.

Los resultados obtenidos confirmaron que *B. velezensis* es una bacteria GRAM +, por su coloración violeta característico y células vegetativas con forma de bastón (bacilos) de extremos redondeados (Figura 1) y reacción catalasa positiva, manifestada por la formación inmediata de burbujas tras la adición de peróxido de hidrógeno (Figura 2). Los resultados fueron consistentes con los perfiles bioquímicos reportados para el género *Bacillus* y la especie *B. velezensis*.

Figura 1

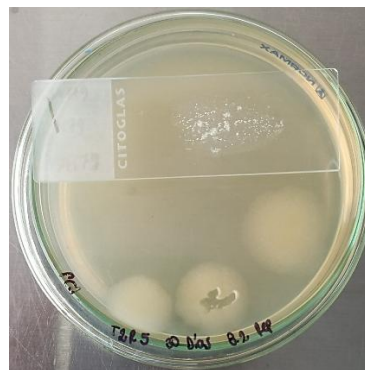
Tinción de Gram para Bacillus velezensis



Nota. Se observan bacilos de color violeta (Gram positivos) en el campo microscópico.

Figura 2

Prueba de catalasa para Bacillus velezensis



Nota. La formación de burbujas evidencia la presencia de la enzima catalasa.

4.1.2. Microencapsulación de *Bacillus velezensis*

4.1.2.1. Características morfológicas de las microcápsulas

Las microcápsulas obtenidas presentaron una morfología esférica y en forma de gota, al igual que un tamaño heterogéneo, con un diámetro estimado en un rango de 1 a 3 mm para

ambos tratamientos (Tabla 3, Anexo A). La variación entre el diámetro de las microcápsulas correspondientes a cada tratamiento se atribuye a la composición y a la técnica, ya que el método de extrusión no permite tener total control sobre el tamaño de la gota formada previo a su interacción con el agente gelificante.

Tabla 3

Rango de diámetro de las microcápsulas de Bacillus velezensis

Tratamiento	Rango de diámetro (mm)
Alginato 1% + Almidón 0.5%	1-2 mm
Alginato 1.5% + Almidón 0.5%	1-3 mm

Nota. El diámetro fue estimado mediante regla milimetrada. No se realizó un análisis estadístico debido a que la medición fue de carácter exploratorio.

4.1.2.2. Concentración inicial de *B. velezensis* en la matriz polimérica previa a la microencapsulación.

La concentración inicial de *Bacillus velezensis* en la matriz polimérica (alginato de sodio + almidón 0.5%) se determinó previo al proceso de microencapsulación, esto permitió establecer la línea base (N0) para poder determinar la eficiencia de encapsulación. Los resultados se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4

Concentración inicial de Bacillus velezensis previo a su microencapsulación.

Tratamientos	Réplicas	Concentración (UFC/ml)
Alginato 1% + Almidón 0.5%	R1	8×10^9
	R2	5.50×10^9
	R3	3.80×10^{10}
	R4	5.50×10^{10}
	R5	1.35×10^{10}
	R6	7.70×10^{10}
Promedio $\pm$ DE		$2.46 \times 10^{10} \pm 2.79 \times 10^{10}$
Alginato 1.5% + Almidón 0.5%	R1	2×10^9
	R2	4.5×10^9
	R3	5×10^9

	R4	6.25 ×10 ¹⁰
	R5	1 ×10 ⁹
	R6	1.5 ×10 ⁹
	Promedio ± DE	1.27 ×10¹⁰ ± 2.31 ×10¹⁰

Nota. Se evaluó la concentración de *Bacillus velezensis* (UFC/mL) incorporada en la matriz polimérica (alginato de sodio + almidón al 0.5%) previo al proceso de microencapsulación. El inóculo inicial (Ferticillus S) presentó una concentración de 1×10¹¹ UFC/mL y un pH de 4.20. Los valores corresponden a 6 réplicas por tratamiento.

La concentración inicial de *Bacillus velezensis* en la matriz polimérica presentó variabilidad entre réplicas para ambos tratamientos. Para el tratamiento con alginato al 1%, los valores oscilaron entre 5.50 ×10⁹ y 7.70 ×10¹⁰ UFC/mL, con un promedio de 2.46 ×10¹⁰ UFC/mL. Por otro lado, el tratamiento con alginato al 1.5% mostró concentraciones entre 1 ×10⁹ y 6.25 ×10¹⁰ UFC/mL, con un promedio de 1.27 ×10¹⁰ UFC/mL. Ambos tratamientos presentaron concentraciones iniciales comparables, permitiendo establecer una línea base homogénea para el cálculo de la eficiencia de encapsulación.

4.1.2.2.1. Estabilización del pH de *Bacillus velezensis* con citrato de sodio

Previo a la formación de las microcápsulas, se ajustó el pH de Ferticillus S (*Bacillus velezensis*) mediante la adición de citrato de sodio, con el fin de alcanzar valores cercanos a la neutralidad que permitieran la correcta gelación iónica de la matriz polimérica (Tabla 5).

Tabla 5

Estabilización de pH de Ferticillus S con citrato de sodio.

Tratamientos	Réplicas	pH Ferticillus S	pH FS+citrato	pH Matriz polimérica
Alginato 1% + Almidón 0.5%	R1	4.20	5.74	6.08
	R2	4.27	5.24	6.08
	R3	4.27	5.24	6.09
	R4	4.18	5.22	6.10
	R5	4.18	5.19	6.11
	R6	4.22	5.25	6.12

Promedio $\pm$ DE		4.22 $\pm$ 0.04	5.31 $\pm$ 0.20	6.10 $\pm$ 0.02
Alginato 1.5% + Almidón 0.5%	R1	4.26	5.26	5.97
	R2	4.26	5.25	5.99
	R3	3.98	5.08	5.92
	R4	4.04	5.14	5.73
	R5	4.04	5.06	5.80
	R6	4.05	5.13	5.75
Promedio $\pm$ DE		4.11 $\pm$ 0.13	5.15 $\pm$ 0.08	5.86 $\pm$ 0.11

Nota. Se presenta la variación de pH de Fericillus S (*Bacillus velezensis*) tras la adición de citrato de sodio y después de su incorporación en la matriz polimérica (alginato de sodio + almidón 0.5%), previo al proceso de microencapsulación. El ajuste de pH a valores cercanos a un rango de 5-6, resulta fundamental para la correcta formación de las microcápsulas mediante la técnica de gelación iónica.

El pH inicial de Fericillus S presentó valores ácidos, con promedios de 4.22 ± 0.04 para el tratamiento con alginato al 1% y 4.11 ± 0.13 para el tratamiento con alginato al 1.5%. Tras la adición de citrato de sodio, el pH se incrementó a valores de 5.31 ± 0.20 y 5.15 ± 0.08 , respectivamente dentro del rango establecido (pH 5-6). Posteriormente, al incorporar Fericillus S estabilizado en la matriz polimérica (alginato + almidón), el pH alcanzó valores cercanos a la neutralidad, con promedios de 6.10 ± 0.02 para el tratamiento T1 y 5.86 ± 0.11 para el tratamiento T2.

Estos resultados demuestran que la adición de citrato de sodio permitió elevar el pH desde valores ácidos (≈ 4.2) hasta un rango de 5.06 a 5.74, y la posterior mezcla con la matriz polimérica elevó aún más el pH hasta valores de 5.73 a 6.12, lo cual resultó adecuado para la formación de microcápsulas por gelación iónica con lactato de calcio.

4.1.1.1. Eficiencia de encapsulación de las formulaciones.

La eficiencia de encapsulación de *Bacillus velezensis* se determinó a las 24 horas post-microencapsulación, calculada como el porcentaje de bacterias viables recuperadas tras la ruptura de las microcápsulas con citrato de sodio al 2% (p/v), en relación con la concentración inicial incorporada en la matriz polimérica. Los resultados se presentan en las Tablas 6, 7 y 8, y en la Figura 3.

Tabla 6

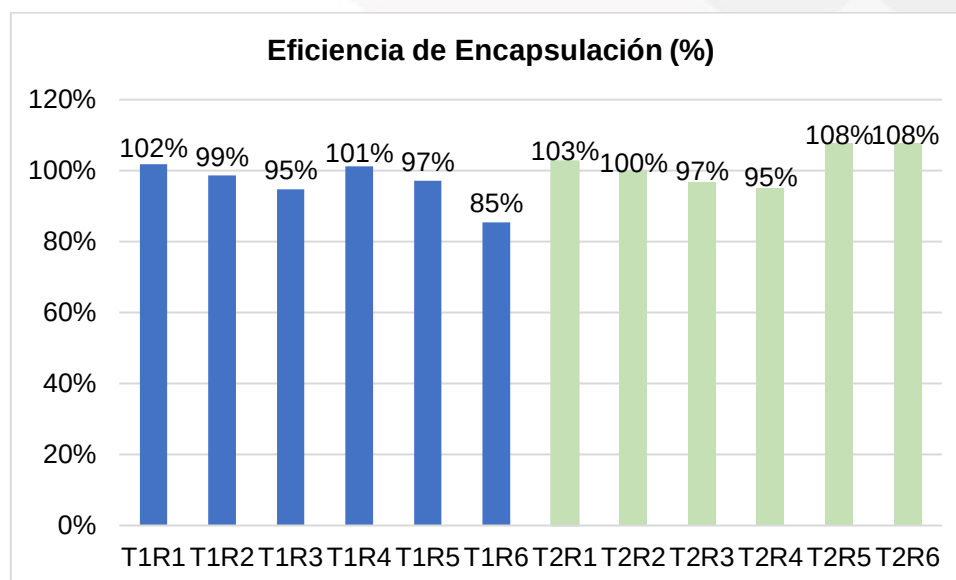
Eficiencia de encapsulación (%) de Bacillus velezensis, a las 24 horas post-microencapsulación

Tratamientos	Réplicas	Matriz Polimérica (Log UFC/ml)	24 H (Log UFC/g)	Eficiencia de Encapsulación (%)
Alginato 1% + Almidón 0,5%	R1	9.9031	10.0792	102%
	R2	9.7404	9.6021	99%
	R3	10.5798	10.0212	95%
	R4	10.7404	10.8751	101%
	R5	10.1303	9.8451	97%
	R6	10.8865	9.3010	85%
Promedio				96,5 ± 6,2%
Alginato 1,5% + Almidón 0,5%	R1	9.3010	9.5441	103%
	R2	9.6532	9.6532	100%
	R3	9.6990	9.3979	97%
	R4	10.7959	10.2553	95%
	R5	9.0000	9.6990	108%
	R6	9.1761	9.9031	108%
Promedio				101,8 ± 5,1%

Nota. La eficiencia de encapsulación (%) se calculó como $(\text{Log } N / \text{Log } N_0) \times 100$. Valores >100% se atribuyen a la variabilidad inherente de la técnica de recuento en placa y a la posible multiplicación bacteriana dentro de la microcápsula durante las primeras 24 horas.

Figura 3

Eficiencia de encapsulación (%) de Bacillus velezensis, a las 24 horas post-microencapsulación



Nota. Las barras representan la eficiencia de encapsulación (%) para cada réplica (R) de los tratamientos (T1 Y T2). T1: Alginato 1% + almidón 0.5%; T2: Alginato 1.5% + almidón 0.5%.

La eficiencia de encapsulación de *Bacillus velezensis* mostró valores elevados para ambos tratamientos (Tabla 6). El tratamiento con alginato al 1% (T1), presentó una eficiencia promedio de $96.5 \pm 6.2\%$, con valores individuales que oscilaron entre rangos de 85-99% y 101-102%. Por su parte, el tratamiento con alginato al 1.5% (T2) mostró una eficiencia promedio de $101,8 \pm 5,1\%$ valores entre rangos de 95-100% y 103-108% (Figura 3).

Ambos tratamientos presentaron valores por encima del 85%, demostrando la eficiencia del proceso de microencapsulación y protección del microorganismo (Tabla 7). Sin embargo, presentan una gran variabilidad presentando valores fuera del rango del 100%, esta variabilidad puede atribuirse a la presencia del alginato y almidón, carbohidratos que pueden ser metabolizados por la bacteria e incrementar su concentración.

Tabla 7

Resumen estadístico de la eficiencia de encapsulación

Tratamiento	Media EE (%)	DE (%)	Min (%)	Max (%)	n
T1	96.5	6.01	85.4	101.77	6
T2	101.69	5.42	94.99	107.92	6

Nota. Los valores corresponden a la media de 6 réplicas por tratamiento $\pm$ desviación estándar (DE). La eficiencia de encapsulación se calculó como $(\text{Log } N / \text{Log } N_0) \times 100$, donde N es la

concentración de bacterias viables recuperadas a las 24 horas post-microencapsulación (Log UFC/g) y N_0 es la concentración inicial en la matriz polimérica (Log UFC/mL).

Tabla 8

Pruebas de normalidad, homogeneidad de varianzas y comparación de medias para la eficiencia de encapsulación

Prueba	Estadístico	gl	p-valor	Decisión
Shapiro-Wilk (T1)	W = 0.9402	6	0.6658	Normal
Shapiro-Wilk (T2)	W = 0.8938	6	0.3294	Normal
Levene	F = 0.0416	1,10	0.8426	Homogéneo
t de Student	t = -1.5742	10	0.1465	No significativo

Nota. Nivel de significancia $\alpha = 0.05$. La prueba t de Student se aplicó asumiendo varianzas homogéneas, según lo confirmado por la prueba de Levene.

En la tabla 8, se presenta el análisis estadístico realizado mediante la prueba t de Student para muestras independientes, el cual mostró que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ($t = -1.5742$, $gl = 10$, $p = 0.1465$). El intervalo de confianza del 95% para la diferencia de medias incluye el valor 0, lo que confirma que ambas formulaciones son estadísticamente equivalentes en términos de eficiencia de encapsulación. Resultado que sugiere que la concentración de alginato de sodio puede ser seleccionada con base en otros criterios, como la estabilidad durante el almacenamiento, sin comprometer la eficiencia de retención celular.

4.1.1.2. Viabilidad y Estabilidad de *B. velezensis* microencapsulado.

La viabilidad y estabilidad de *Bacillus velezensis* microencapsulado se evaluaron durante 30 días de almacenamiento, con mediciones a los 7, 14, 21 y 30 días. Los resultados se expresan como porcentaje de eficiencia de encapsulación relativo al día 0 (post-microencapsulación) en la Tabla 9 y Figura 4, y como Log UFC/g en la Tabla 10 y Figura 5. Las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y el análisis de varianza bifactorial (ANOVA) se presentan en las Tablas 10 y 11, respectivamente.

Tabla 9

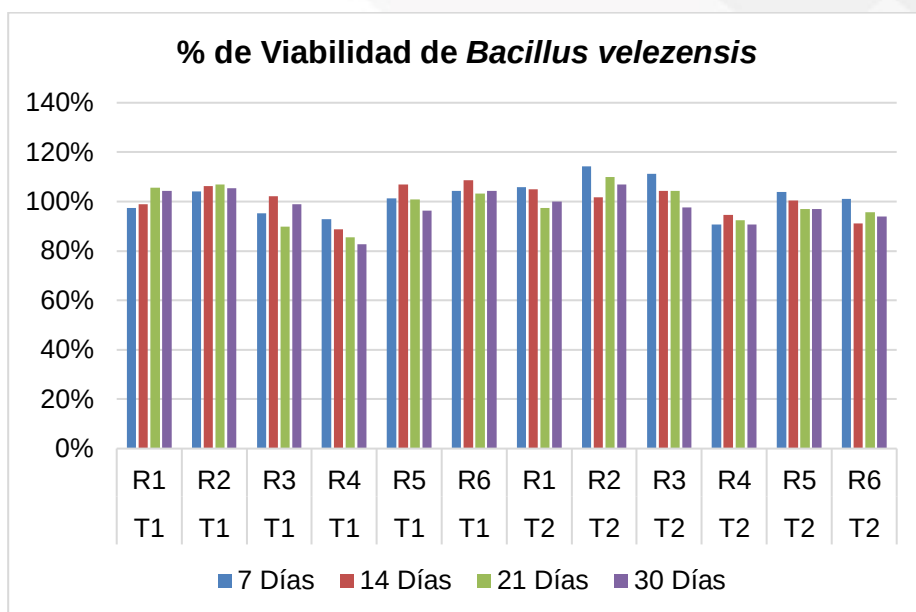
Viabilidad y Estabilidad de Bacillus velezensis microencapsulado, durante su almacenamiento (expresado en % EE relativo al día 0)

Tratamientos	Réplicas	Viabilidad y Estabilidad			
		7 Días	14 Días	21 Días	30 Días
Alginato 1% + Almidón 0,5%	R1	97%	99%	106%	104%
	R2	104%	106%	107%	105%
	R3	95%	102%	90%	99%
	R4	93%	89%	86%	83%
	R5	101%	107%	101%	96%
	R6	104%	109%	103%	104%
	Media ± DE	95,5 ± 5,5	98,3 ± 6,1	95,2 ± 9,9	93,7 ± 9,8
Alginato 1,5% + Almidón 0,5%	R1	106%	105%	97%	100%
	R2	114%	102%	110%	107%
	R3	111%	104%	104%	98%
	R4	91%	95%	92%	91%
	R5	104%	100%	97%	97%
	R6	101%	91%	96%	94%
	Media ± DE	106.3 ± 10.5	101.2 ± 6.9	101.0 ± 7.5	97.5 ± 5.3

Nota. La viabilidad y estabilidad se expresan como porcentaje de eficiencia de encapsulación relativo al día 0 (post-microencapsulación), calculado como $(\text{Log } N_t / \text{Log } N_0) \times 100$.

Figura 4

Viabilidad y Estabilidad de Bacillus velezensis microencapsulado, durante su almacenamiento en períodos de 7, 14, 21 y 30 Días.



Nota. Las barras representan el porcentaje de eficiencia de encapsulación relativo al día 0 para cada réplica y tratamiento.

Tabla 10

*Viabilidad de *Bacillus velezensis* microencapsulado expresada en Log UFC/g durante el almacenamiento*

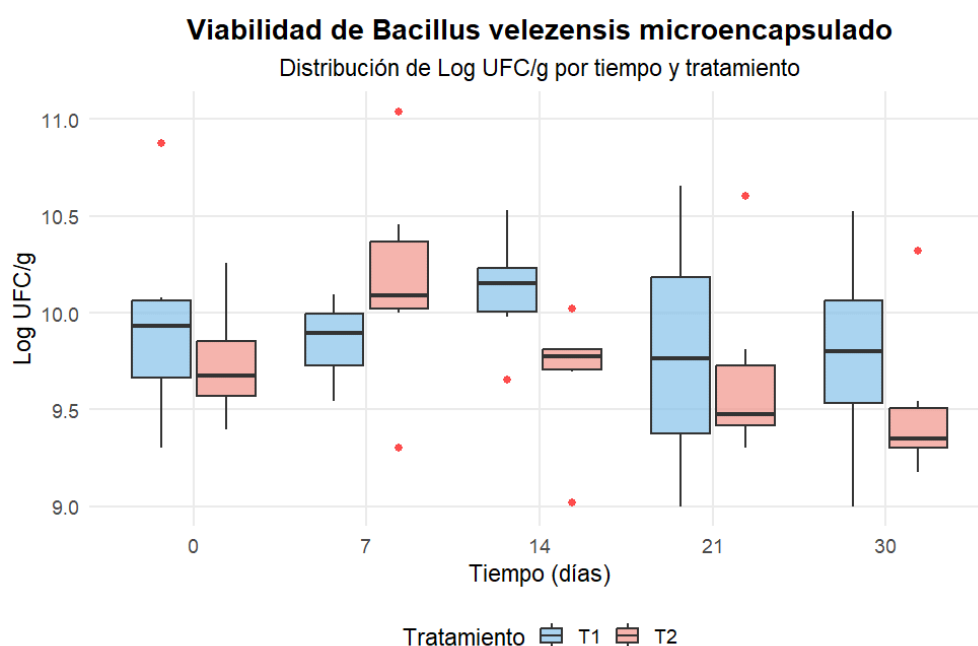
Tratamiento	Tiempo (días)	Log UFC/g (Media ± DE)
Alginato 1% + Almidón 0,5%	0	9.95 ± 0.53
	7	9.86 ± 0.21
	14	10.12 ± 0.29
	21	9.79 ± 0.61
	30	9.79 ± 0.53
Alginato 1,5% + Almidón 0,5%	0	9.74 ± 0.30
	7	10.16 ± 0.57
	14	9.68 ± 0.34
	21	9.68 ± 0.48

Tratamiento	Tiempo (días)	Log UFC/g (Media $\pm$ DE)
	30	9.51 $\pm$ 0.42

Nota. Los valores corresponden al promedio de 6 réplicas por tratamiento $\pm$ desviación estándar.

Figura 5

Viabilidad de Bacillus velezensis microencapsulado durante el almacenamiento (distribución de Log UFC/g por tiempo y tratamiento).



Nota. Las cajas representan el rango intercuartílico de Log UFC/g para cada tiempo y tratamiento. La línea dentro de cada caja indica la mediana. T1: Alginato 1% + almidón 0.5%; T2: Alginato 1.5% + almidón 0.5%.

Tabla 11

Pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) para la viabilidad de Bacillus velezensis microencapsulado

Tratamientos	Tiempo (días)	p-valor	Normal
Alginato 1% + Almidón 0,5%	0	0.684	Sí
	7	0.742	Sí
	14	0.942	Sí
	21	0.964	Sí
	30	1.000	Sí
Alginato 1,5% +	0	0.679	Sí

Almidón 0,5%	7	0.752	Sí
	14	0.045	No
	21	0.034	No
	30	0.024	No

Nota. Nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

Tabla 12

Análisis de varianza bifactorial para la viabilidad de Bacillus velezensis microencapsulado

Fuente de variación	gl	SC	CM	F	p-valor	Significancia (Tukey)
Tratamiento	1	0.321	0.321	1.593	0.213	a
Tiempo	4	0.958	0.240	1.188	0.328	a
Tratamiento x Tiempo	4	0.932	0.233	1.155	0.342	a
Error	50	10.083	0.202	—	—	—

Nota. No se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$). La variable dependiente fue Log UFC/g.

La viabilidad y estabilidad de *Bacillus velezensis* microencapsulado se mantuvieron en valores elevados durante los 30 días de almacenamiento para ambos tratamientos. El tratamiento con alginato 1.5% (T2) presentó porcentajes de viabilidad promedio superiores al tratamiento con alginato al 1% (T1) en todos los tiempos evaluados. Además, ambos tratamientos presentaron variabilidad en sus resultados, para el Tratamiento 1 en la evaluación a los 7 días se determinaron rangos de 89-99% y 103%; a los 14 días rangos de 90-97% y 101-105%; a los 21 días rangos de 85-98% y 105-108%, y a los 30 días rangos de 84-94% y 104-106%. Asimismo, el Tratamiento 2 presentó variabilidad, a los 7 días 86% y 109-114%; a los 14 días rangos de 90-98% y 101-108%; a los 21 días rangos de 88-100% y 101-110%, y a los 30 días 86-95% y 101-107% (Tabla 9 y Figura 4). Este comportamiento indica que *Bacillus velezensis* atraviesa un período inicial de adaptación, las bacterias microencapsuladas logran mantener su viabilidad en niveles elevados durante el período de 30 días de almacenamiento.

En cuanto a los valores de Log UFC/g (Tabla 10 y Figura 5), el tratamiento T1 mostró valores que oscilaron entre 9.79 y 10.12 durante los 30 días, con un valor inicial de 9.95 y un valor final de 9.79. El tratamiento T2 presentó valores entre 9.51 y 10.16, con un valor inicial

de 9.74 y un valor final de 9.51. Ambos tratamientos mantuvieron niveles elevados de viabilidad durante los 30 días de almacenamiento, con valores que se mantuvieron por encima de 9.5 Log UFC/g en todos los tiempos evaluados.

El análisis de varianza bifactorial (ANOVA) permitió determinar que no se evidenciaron diferencias significativas del tratamiento ($p = 0.213$), del tiempo ($p = 0.328$) ni de la interacción entre ambos factores ($p = 0.342$) sobre la viabilidad de *Bacillus velezensis* microencapsulado expresada en Log UFC/g (Tabla 11). Estos resultados indican que la viabilidad se mantuvo estable durante los 30 días de almacenamiento en ambos tratamientos, sin que la concentración de alginato de sodio influyera de manera significativa en la supervivencia bacteriana. La prueba de comparación múltiple de Tukey confirmó que no existen diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p > 0.05$), ya que todos los tratamientos y tiempos de almacenamiento pertenecen al mismo grupo (Tabla 12).

4.1.1.2.1. Cinética de viabilidad de *Bacillus velezensis* microencapsulado durante su almacenamiento.

La cinética de viabilidad de *Bacillus velezensis* microencapsulado se evaluó mediante el seguimiento de la población bacteriana en función del tiempo de almacenamiento (0, 7, 14, 21 y 30 días). Los valores de Log UFC/g se determinaron a partir del recuento en placa tras la ruptura de las microcápsulas con citrato de sodio al 2% (p/v). Los resultados se presentan en la Tabla 13 y la Figura 6, la Tabla 14 y la Figura 7.

La Tabla 13 presenta los valores de Log UFC/g obtenidos para cada réplica individual de ambos tratamientos (T1 y T2) en los tiempos de almacenamiento evaluados. Para el tratamiento con alginato al 1% (T1), los valores oscilaron entre 9.000 y 10.875 Log UFC/g, mientras que para el tratamiento con alginato al 1.5% (T2) se registraron valores entre 9.021 y 11.039 Log UFC/g.

Tabla 13

Datos de viabilidad de Bacillus velezensis microencapsulado expresados en Log UFC/g durante el almacenamiento

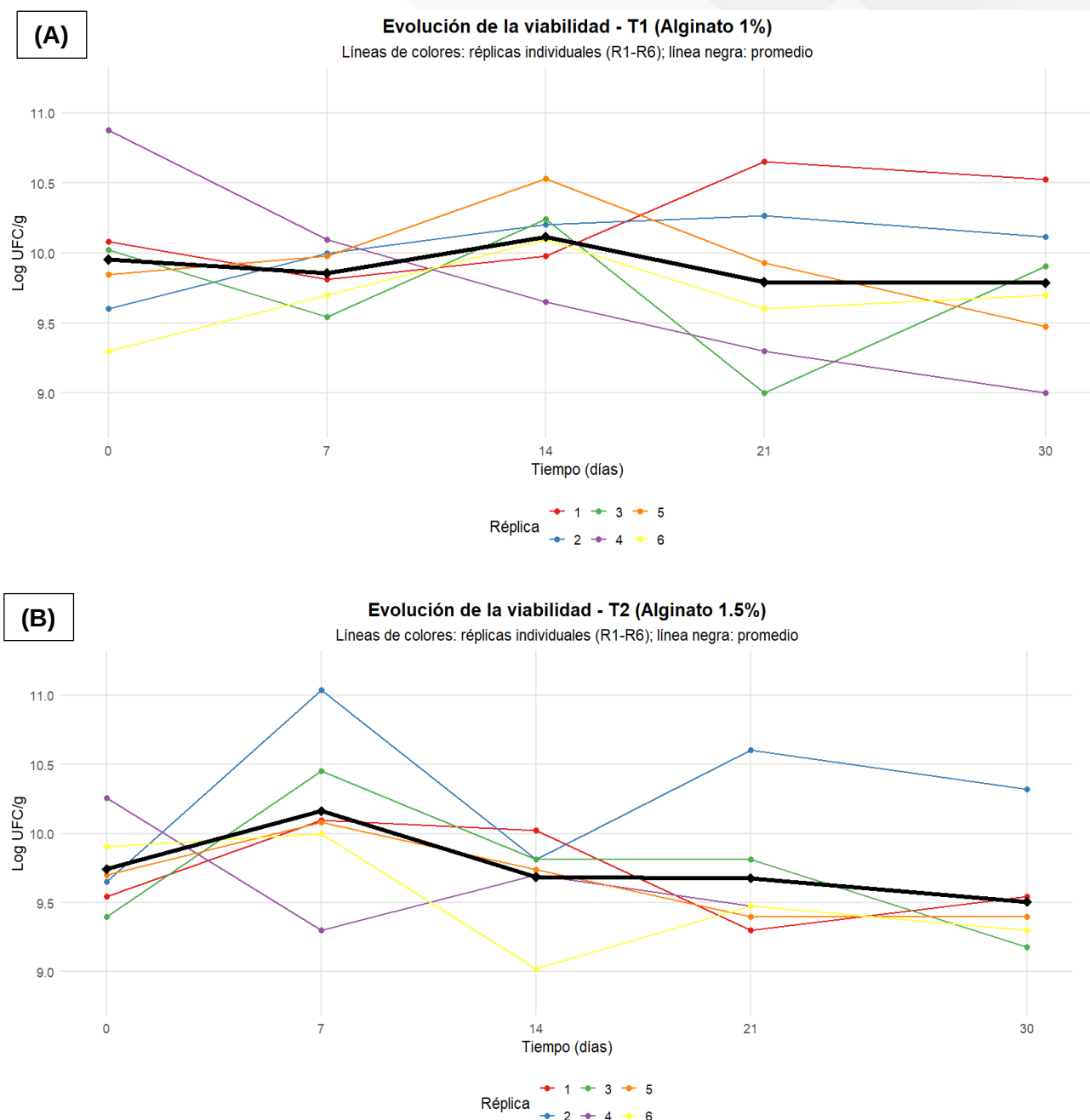
Tratamientos	Réplicas	24 H	7 Días	14 Días	21 Días	30 Días
Alginato 1% + Almidón 0,5%	R1	10.079	9.813	9.978	10.653	10.525
	R2	9.602	10.000	10.204	10.267	10.114
	R3	10.021	9.544	10.243	9.000	9.903
	R4	10.875	10.097	9.653	9.301	9.000
	R5	9.845	9.978	10.531	9.929	9.477
	R6	9.301	9.699	10.097	9.602	9.699
Alginato 1,5% + Almidón 0,5%	R1	9.544	10.097	10.021	9.301	9.544
	R2	9.653	11.039	9.813	10.602	10.322
	R3	9.398	10.455	9.813	9.813	9.176
	R4	10.255	9.301	9.699	9.477	9.301
	R5	9.699	10.079	9.740	9.398	9.398
	R6	9.903	10.000	9.021	9.477	9.301

Nota. Los valores expresados en Log UFC/g corresponden al logaritmo en base 10 de las unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) de *Bacillus velezensis* recuperadas tras la ruptura de las microcápsulas con citrato de sodio al 2% (p/v). Los datos corresponden a 6 réplicas por tratamiento, evaluadas en los tiempos de 24 horas (día 0), 7, 14, 21 y 30 días de almacenamiento.

Se observó una alta variabilidad entre réplicas dentro de cada tratamiento, la cual puede atribuirse al proceso de microencapsulación y a la técnica de recuento en placa. Esta variabilidad justifica el análisis individual de cada réplica para la determinación de los parámetros cinéticos de viabilidad. A pesar de la variabilidad presentada, no se evidenció una tendencia de disminución clara y consistente en todos los tiempos evaluados, lo que sugiere que la población bacteriana se mantuvo estable durante el período de almacenamiento.

Figura 6

Evolución de la viabilidad de Bacillus velezensis microencapsulado



Nota. Las líneas de colores representan la evolución de Log UFC/g para cada réplica individual (R1-R6). La línea negra gruesa representa el promedio de las 6 réplicas en cada tiempo de muestreo. (A)=T1: Alginato 1% + almidón 0.5% y (B)=T2: Alginato 1.5% + almidón 0.5%.

La Figura 6 muestra la evolución de la viabilidad de *Bacillus velezensis* microencapsulado con alginato al 1% (T1) y al 1.5% (T2) durante 30 días de almacenamiento. Para ambos tratamientos, las seis réplicas individuales presentaron un comportamiento variable a lo largo del tiempo, evidenciado por las líneas de colores que muestran trayectorias diferenciadas entre sí, reflejando la variabilidad propia del proceso de

microencapsulación por extrusión, donde factores como el tamaño de las gotas, la distribución de las bacterias dentro de la matriz polimérica y las condiciones de gelación pueden influir en la supervivencia celular de cada lote de microcápsulas.

En el tratamiento T1 (Figura 6A), la mayoría de las réplicas mantuvieron valores de Log UFC/g entre 9.5 y 10.5 durante los primeros 21 días de almacenamiento, con algunas réplicas (R1, R2 y R5) que mostraron un incremento en la viabilidad hacia el día 21, alcanzando valores cercanos a 10.5 Log UFC/g. Por otro lado, la réplica R4 presentó una disminución progresiva desde el inicio del almacenamiento, alcanzando su valor más bajo (9.0 Log UFC/g) a los 30 días, mientras que la réplica R6 mostró una estabilidad relativa con valores alrededor de 9.7 Log UFC/g durante todo el período.

En el tratamiento T2 (Figura 6B), se destaca el comportamiento de la réplica R2, que presentó el valor más alto registrado en todo el estudio (11.039 Log UFC/g) a los 7 días, seguido de un descenso progresivo hasta los 30 días (10.322 Log UFC/g). Este notable crecimiento podría atribuirse a la multiplicación bacteriana dentro de la microcápsula durante los primeros días de almacenamiento, favorecida por la disponibilidad de nutrientes (almidón) y las condiciones de protección que ofrece la matriz polimérica. La réplica R3 también mostró valores elevados a los 7 días (10.455 Log UFC/g), manteniendo niveles superiores a 9.0 Log UFC/g durante todo el período. La réplica R4 presentó el comportamiento más estable, con valores que variaron entre 9.301 y 10.255 Log UFC/g durante el almacenamiento, mientras que las réplicas R1, R5 y R6 mostraron comportamientos similares con valores que se mantuvieron entre 9.021 y 10.079 Log UFC/g a lo largo del experimento.

En ambos tratamientos, la línea negra gruesa (promedio de las seis réplicas) evidenció un comportamiento estable con una ligera tendencia al descenso hacia el final del período evaluado. Para T1, el promedio pasó de 9.95 Log UFC/g en el día 0 a 9.79 Log UFC/g a los 30 días; mientras que para T2, el promedio pasó de 9.74 Log UFC/g a 9.51 Log UFC/g en el mismo período. Ambos tratamientos mantuvieron la viabilidad bacteriana en niveles elevados (>9.5 Log UFC/g en promedio) durante los 30 días de almacenamiento, lo que confirma que la microencapsulación con alginato de sodio (1% y 1.5%) y almidón al 0.5% constituye una

estrategia eficaz para proteger la viabilidad de *Bacillus velezensis* durante el almacenamiento.

El incremento en algunas réplicas durante los primeros 7-14 días sugiere que las bacterias encapsuladas pueden metabolizar el almidón presente en la matriz polimérica, incrementando temporalmente su concentración, fenómeno que explica los valores de eficiencia de encapsulación superiores al 100% observados en el presente estudio y que ha sido documentado por otros autores que reportaron el crecimiento de bacterias encapsuladas dentro de matrices poliméricas que contienen carbohidratos fermentables.

La mayor variabilidad observada en el tratamiento T2 podría atribuirse a que la mayor concentración de alginato (1.5%) modifica las propiedades de la matriz, afectando la distribución de las bacterias y la difusión de nutrientes dentro de la microcápsula. Sin embargo, esta variabilidad no afectó significativamente el desempeño general del tratamiento, ya que los valores promedio de viabilidad se mantuvieron estables durante todo el período evaluado.

Tabla 14

Parámetros cinéticos del modelo de Weibull para la viabilidad de Bacillus velezensis microencapsulado

Tratamiento	Log N ₀ (Log UFC/g)	α (días)	B	R ²
T1 (Alginato 1%)	9.955	52.43	3.016	0.3155
T2 (Alginato 1.5%)	9.904	47.16	1.935	0.4864

Nota. Log N₀: Log UFC/g inicial estimado por el modelo; α: parámetro de escala (días); β: parámetro de forma; R²: coeficiente de determinación.

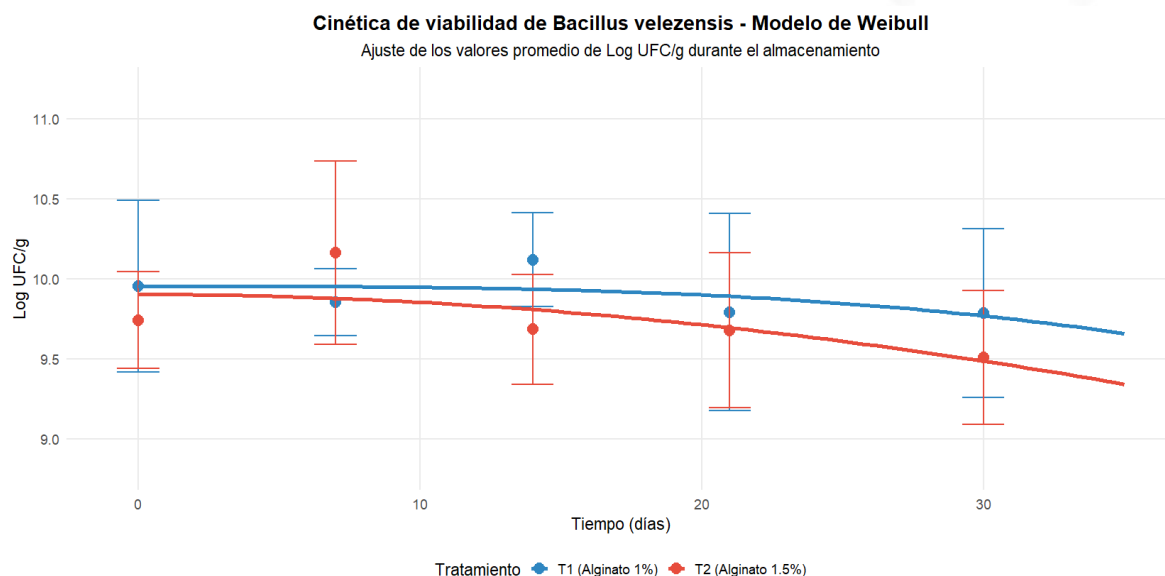
Los parámetros cinéticos del modelo de Weibull (Tabla 14) mostraron valores de β > 1 para ambos tratamientos (3.016 para T1 y 1.935 para T2), mientras que el parámetro α fue de 52.43 días para T1 y de 47.16 días para T2, lo que sugiere que el tratamiento T1 retrasa ligeramente el inicio de la disminución poblacional en comparación con T2. Esto podría deberse a que la menor concentración de alginato permite una mayor disponibilidad de nutrientes (almidón) para las bacterias encapsuladas, prolongando su viabilidad.

El coeficiente de determinación R² fue de 0.3155 y 0.4864 para T1 y T2,

respectivamente. Estos valores, aunque moderados, son superiores a los obtenidos con el modelo lineal ($R^2 = 0.2155$ y 0.3935), lo que confirma que el modelo de Weibull describe mejor el comportamiento de la viabilidad bacteriana durante el almacenamiento.

Figura 7

Cinética de viabilidad de Bacillus velezensis - Modelo de Weibull



Nota. Los puntos representan los valores promedio de Log UFC/g en cada tiempo de muestreo ($n=6$). Las líneas continuas representan el ajuste del modelo de Weibull para cada tratamiento. Las barras de error indican la desviación estándar. T1: Alginato 1% + almidón 0.5%; T2: Alginato 1.5% + almidón 0.5%.

La Figura 7 muestra el ajuste del modelo de Weibull a los datos experimentales, donde se observa que las curvas ajustadas (líneas continuas) describen adecuadamente la tendencia general de los datos (puntos) para ambos tratamientos. El modelo captura la fase de estabilidad inicial y la posterior disminución de la viabilidad, confirmando su idoneidad para describir la cinética de viabilidad de *B. velezensis* microencapsulado durante el almacenamiento.

CAPÍTULO V: Discusión, Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Discusión

5.1.1. Caracterización fenotípica de *Bacillus velezensis*

Los resultados obtenidos permitieron confirmar que la cepa de *Bacillus velezensis* utilizada en el presente estudio es una bacteria Gram positiva y catalasa positiva, coincidiendo con los perfiles reportados para el género *Bacillus* y la especie *B. velezensis*. Estos hallazgos son consistentes con lo descrito por Rabbee et al. (2019) quienes reportaron que *B. velezensis* presenta morfología bacilar Gram positiva y reacción positiva a catalasa, ya que la capacidad de producir catalasa es una característica distintiva que permite a estas bacterias descomponer el peróxido de hidrógeno, protegiéndose de especies reactivas de oxígeno y facilitando su supervivencia en condiciones adversas. Estos hallazgos corroboran la identidad taxonómica de la cepa proporcionada por ECOCYCLEBIOTECH, validando su uso en los ensayos de microencapsulación.

5.1.2. Microencapsulación de *Bacillus velezensis*

5.1.2.1. Medición del diámetro de las microcápsulas.

Las microcápsulas obtenidas presentaron un diámetro promedio de 1-3 mm. Además, se observó que su estructura y forma no se vio afectada durante el período de evaluación. Benítez et al. (2024) menciona que al añadir almidón mejora la retención de agua, lo cual permite mantener una distribución de tamaño uniforme, obteniendo microesferas de tamaño de diámetro promedio de $3.58 \text{ mm} \pm 0.18$. Las microcápsulas obtenidas presentan un diámetro promedio de hasta 3 mm, la variabilidad del tamaño se atribuye al método utilizado para la formación de las microcápsulas (método de extrusión) y el tamaño de aguja (21G). Por ello, es posible determinar que el proceso de microencapsulación permitió obtener en su mayoría microcápsulas, encajando en la definición de tamaño que varía entre 50 nm a 2mm (Reyna et al., 2015).

5.1.2.2. Estabilización del pH y concentración inicial.

El ajuste del pH de Fericillus S (pH inicial de 4.20) mediante la adición de citrato de sodio resultó fundamental para lograr la correcta formación de las microcápsulas. Alcanzar

valores entre el rango de 5-6, permitió la gelación iónica óptima del alginato de sodio con el lactato de calcio, ya que a pH ácido el alginato no forma estructuras estables con los iones calcio. La variación del pH final entre tratamientos (6.10 ± 0.02 para T1 y 5.86 ± 0.11 para T2) sugiere que la mayor concentración de alginato puede modificar ligeramente la capacidad buffer de la solución, aunque ambos valores se mantuvieron dentro del rango adecuado para la encapsulación.

Guo et al. (2022) demostró en su estudio que el citrato de sodio actúa como una solución tampón, ya que posee la capacidad de ajuste de pH, estabilidad y propiedades amortiguadoras convirtiéndolo en el candidato idóneo para la estabilización del pH en caldos fermentativos, estudio en el cual se evaluó el comportamiento de citrato de sodio como tampón en una concentración de 0.05 mol/L.

Las concentraciones iniciales de *B. velezensis* en la matriz polimérica fueron comparables entre tratamientos (2.46×10^{10} UFC/mL para T1 y 1.27×10^{10} UFC/mL para T2), con una variabilidad atribuible a la heterogeneidad de la suspensión bacteriana, sin embargo, es posible determinar que la concentración del inóculo se mantiene elevada, ya que el inóculo inicial (Ferticillus S) presentó una concentración elevada de 1×10^{11} UFC/mL, la cual no se vio afectada al mezclar con la solución polimérica.

5.1.2.3. Eficiencia de encapsulación.

La eficiencia de encapsulación obtenida en el presente estudio ($96.5 \pm 6.2\%$ para T1 y $101.8 \pm 5.1\%$ para T2) es notablemente superior a lo reportado en investigaciones previas. Moradi Pour et al. (2022) reportaron que las microcápsulas de alginato con gomas naturales protegieron >60% de las células bacterianas de *B. velezensis* BV9. Así mismo, la evaluación de diferentes concentraciones de alginato (1%, 1.5% y 2%) para la encapsulación de *Bacillus* spp. mostró eficiencias de encapsulación de 1%, 0.36% y 1.35%, respectivamente. Esta evidente diferencia sugiere que la técnica de gelación iónica con extrusión empleada en el presente estudio, combinada con el uso de lactato de calcio y citrato de sodio, es altamente eficiente para la retención de *B. velezensis*.

Los valores superiores al 100% observados en algunas réplicas (102-108%) se

atribuyen a la variabilidad inherente de la técnica de recuento en placa y a la posible multiplicación bacteriana dentro de la microcápsula durante las primeras 24 horas post-microencapsulación. Este fenómeno ha sido reportado previamente en estudios de microencapsulación de bacterias, donde se ha documentado que las microcápsulas de alginato-almidón pueden mantener la viabilidad bacteriana durante períodos prolongados, ya que la matriz polimérica provee un microambiente adecuado la supervivencia celular (Sawatphanit et al., 2022).

La prueba t de Student mostró que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p = 0.1465$), lo que sugiere que ambas concentraciones de alginato (1% y 1.5%) son igualmente eficientes para la retención celular. Este resultado es relevante desde una perspectiva práctica, ya que permite seleccionar la concentración de alginato con base en criterios económicos sin comprometer la eficiencia del proceso.

5.1.2.4. Viabilidad y estabilidad durante el almacenamiento.

La viabilidad y estabilidad de *B. velezensis* microencapsulado se mantuvieron en niveles elevados durante los 30 días de almacenamiento para ambos tratamientos, con valores de Log UFC/g superiores a 9.5 en todos los tiempos evaluados. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Sawatphanit et al. (2022), quienes desarrollaron formulaciones de *B. velezensis* N1 que mantuvieron su viabilidad durante 3 meses de almacenamiento a temperatura ambiente, con una reducción de viabilidad de 0.61 Log UFC/g para la mejor formulación.

El tratamiento con alginato al 1.5% (T2) presentó porcentajes de viabilidad promedio superiores a T1 en todos los tiempos evaluados, aunque sin diferencias estadísticamente significativas (ANOVA $p > 0.05$). Este comportamiento sugiere que la mayor concentración de alginato podría ofrecer una protección ligeramente superior, fenómeno que ha sido documentado por Murthy et al. (2025) quienes encontraron que concentraciones de alginato entre 1-2% mejoran la viabilidad de *Bacillus* spp. encapsulado al formar redes poliméricas más densas que limitan la difusión de oxígeno y compuestos tóxicos.

El análisis de varianza bifactorial confirmó que no existen efectos significativos del

tratamiento ($p = 0.213$), del tiempo ($p = 0.328$) ni de la interacción entre ambos factores ($p = 0.342$). Estos resultados indican que la viabilidad se mantuvo estable durante los 30 días de almacenamiento en ambos tratamientos, lo que sugiere que la matriz polimérica de alginato-almidón confiere una protección efectiva a las células bacterianas durante el almacenamiento. La presencia de almidón en la formulación es relevante, ya que este polisacárido actúa como una barrera física adicional y como fuente de carbono que puede ser metabolizada por las bacterias, extendiendo su viabilidad (Vieira Velloso, 2024). Estudios previos han documentado que el almidón, cuando se combina con alginato, forma una red más compacta que reduce la permeabilidad y protege a las células de factores ambientales adversos (Hernández Mendoza et al., 2018).

5.1.2.5. Cinética de viabilidad.

Los parámetros cinéticos del modelo de Weibull mostraron valores de $\beta > 1$ para ambos tratamientos (3.016 para T1 y 1.935 para T2). Según van Boekel (2002), un valor de $\beta > 1$ indica que la curva de supervivencia presenta una concavidad hacia abajo, lo que significa que las células remanentes se ven afectadas con el tiempo, acelerando la muerte bacteriana en las etapas finales del almacenamiento. Este comportamiento es consistente con lo observado en los datos experimentales, donde la viabilidad se mantuvo estable durante las primeras dos semanas y luego comenzó a disminuir de manera más pronunciada.

El parámetro α fue de 52.43 días para T1 y de 47.16 días para T2, lo que sugiere que el tratamiento T1 retrasa ligeramente el inicio de la disminución poblacional en comparación con T2. Esto podría deberse a que la menor concentración de alginato permite una mayor disponibilidad de nutrientes (almidón) para las bacterias encapsuladas, prolongando su viabilidad. Hiura et al. (2020) demostraron que el modelo de Weibull con parámetro de forma $\beta > 1$ describe adecuadamente la inactivación de *E. coli* O157:H7 en condiciones ácidas, con una concavidad ascendente que es consistente con los hallazgos del presente estudio.

El coeficiente de determinación R^2 fue de 0.3155 para T1 y de 0.4864 para T2, indicando que el modelo explica el 31.55% y 48.64% de la variación de los datos, respectivamente. Estos valores reflejan la variabilidad de los datos experimentales. Estudios

han documentado que los modelos no lineales, como el de Weibull, resultan apropiados para describir la inactivación microbiana en sistemas complejos, ya que capturan la variabilidad biológica propia de las poblaciones bacterianas (van Boekel, 2002; Hiura et al., 2020).

Los resultados obtenidos son consistentes con investigaciones previas que han evaluado la viabilidad de *Bacillus* spp. encapsulado. Ethica et al. (2025) reportaron que microcápsulas a base de alginato conteniendo *Bacillus* spp. mantuvieron la viabilidad celular después de un año de almacenamiento a temperatura ambiente. Asimismo, Moradi Pour et al. (2022) demostraron que la encapsulación de *B. velezensis* BV9 en sistemas de alginato mejoró la supervivencia bacteriana y la liberación controlada, con una eficiencia de liberación del 94.33%.

El comportamiento observado en la cinética de viabilidad, con $\beta > 1$ en ambos tratamientos, sugiere que las células bacterianas encapsuladas experimentan un proceso de daño acumulativo durante el almacenamiento. Este fenómeno ha sido documentado en estudios de inactivación microbiana, donde se ha demostrado que la población bacteriana no sigue una tasa de muerte constante, sino que la susceptibilidad al daño aumenta con el tiempo (van Boekel, 2002). La observación de una mayor estabilidad de *Bacillus velezensis* en las primeras etapas del almacenamiento podría explicarse por la presencia de almidón en la matriz polimérica, el cual actuaría como un sustrato que mantiene el metabolismo bacteriano. Este hallazgo es consistente con lo reportado por Sultana et al., (2000) quienes reportaron que la adición de almidón resistente a cápsulas de alginato incrementó significativamente la supervivencia de probióticos, manteniendo una alta viabilidad durante 135 días a temperatura ambiente. Los autores atribuyeron este efecto a la capacidad del almidón para funcionar como un prebiótico, proporcionando una fuente de energía para las células atrapadas dentro de la microcápsula. De manera similar, investigaciones recientes confirman que la inclusión de almidón en matrices de alginato mejora la viabilidad y estabilidad de diversas bacterias encapsuladas durante el almacenamiento (Martin et al., 2013).

5.2. Conclusiones

La caracterización fenotípica confirmó que la cepa de *Bacillus velezensis* utilizada en

el estudio es Gram positiva y catalasa positiva, validando su identidad taxonómica para los ensayos de microencapsulación.

Se formularon exitosamente microcápsulas de *Bacillus velezensis* mediante gelación iónica con alginato de sodio (1% y 1.5%) y almidón al 0.5%, obteniendo microcápsulas de morfología esférica y en forma de gota con diámetros de 1 a 3 mm. El ajuste del pH con citrato de sodio resultó fundamental para la correcta formación de las microcápsulas, alcanzándose valores de 6.10 ± 0.02 para T1 y 5.86 ± 0.11 para T2. La concentración inicial de *B. velezensis* en la matriz polimérica fue comparable entre tratamientos (2.46×10^{10} UFC/mL para T1 y 1.27×10^{10} UFC/mL para T2), permitiendo estandarizar condiciones iniciales para los análisis posteriores.

La eficiencia de encapsulación a las 24 horas post-microencapsulación fue de $96.5 \pm 6.2\%$ para T1 y de $101.8 \pm 5.1\%$ para T2. La prueba t de Student no mostró diferencias significativas entre tratameintos ($t = -1.5742$, $gl = 10$, $p = 0.1465$). Ambos tratamientos mantuvieron la viabilidad bacteriana en niveles superiores a 9.5 Log UFC/g durante los 30 días de almacenamiento. El ANOVA bifactorial confirmó que no existen diferencias significativas del tratamiento ($p = 0.213$), del tiempo ($p = 0.328$) ni de su interacción ($p = 0.342$) sobre la viabilidad bacteriana.

La cinética de viabilidad, evaluada mediante el modelo de Weibull, mostró valores de $\beta > 1$ para ambos tratamientos (3.016 para T1 y 1.935 para T2), indicando una curva de supervivencia con concavidad hacia abajo. El parámetro α fue de 52.43 días para T1 y 47.16 días para T2, sugiriendo que el tratamiento T1 retrasa ligeramente el inicio de la disminución poblacional. Los coeficientes de determinación fueron de 0.3155 (T1) y 0.4864 (T2).

La hipótesis nula (H_0), que proponía que la formulación con alginato al 1.5% presenta mayor eficiencia, viabilidad y estabilidad, no es respaldada por los resultados, ya que el análisis estadístico no evidenció diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$). Ambas formulaciones son equivalentes en las condiciones evaluadas.

Finalmente, se concluye que las diferentes concentraciones de alginato de sodio (1% y 1.5%) en combinación con almidón al 0.5% no influyen de manera significativa en la

viabilidad y estabilidad de *Bacillus velezensis* microencapsulado durante 30 días de almacenamiento. La selección de la concentración de alginato puede basarse en criterios económicos sin comprometer la calidad del bioinsumo.

5.3. Recomendaciones

A partir de los resultados obtenidos en la presente investigación, se formulan las siguientes recomendaciones:

- En vista de que no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de alginato de sodio al 1% y 1.5%, se recomienda evaluar concentraciones menores a 1% o si bien concentraciones mayores, según la capacidad de poder cubrir los costos que requiera el estudio. Esto permitirá determinar la formulación que permite obtener una mejor viabilidad y estabilidad de *Bacillus velezensis* durante el almacenamiento.
- Se sugiere explorar la combinación de alginato de sodio con otros biopolímeros (como quitosano, pectina o gomas naturales) para mejorar las propiedades de barrera de la matriz polimérica y prolongar la vida útil del bioinsumo.
- El modelo de Weibull mostró un mejor ajuste moderado, por lo que se recomienda evaluar otros modelos no lineales que podrían ofrecer una descripción más precisa de la cinética de inactivación microbiana al considerar fases de latencia, crecimiento y muerte celular.
- Se recomienda implementar métodos automatizados de recuento celular (como citometría de flujo o qPCR) para cuantificar con mayor precisión la concentración de bacterias viables en las microcápsulas.
- Se sugiere extender el período de evaluación de la viabilidad más allá de los 30 días para determinar la vida útil máxima del bioinsumo y establecer fechas de vencimiento adecuadas para su comercialización, considerando que en el presente estudio la vida media superó los 23 días en ambos tratamientos.
- Se recomienda realizar estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM) para caracterizar la morfología, tamaño y distribución de las microcápsulas, así como la integridad de la matriz polimérica antes y después del almacenamiento. En el presente

estudio, el diámetro fue estimado con regla milimetrada sin análisis estadístico, por lo cual, estas técnicas permitirán una caracterización más precisa.

- Se sugiere evaluar la eficiencia de encapsulación mediante técnicas complementarias como espectroscopía FTIR o termogravimetría (TGA), que permitan confirmar la interacción entre los polímeros y la bacteria, y determinar la estabilidad térmica de las microcápsulas.
- Se recomienda validar la efectividad del bioinsumo microencapsulado en condiciones de campo, evaluando su modo de aplicación y su capacidad para promover el crecimiento de plantas y controlar fitopatógenos en cultivos agrícolas.
- Se sugiere comparar el desempeño del bioinsumo microencapsulado con formulaciones líquidas tradicionales de *Bacillus velezensis*, para determinar si la microencapsulación ofrece ventajas significativas en términos de viabilidad, estabilidad y efectividad agronómica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afzaal, M., Saeed, F., Hussain, M., Ismail, Z., & Siddeeg, A. (2022). Influence of encapsulation on the survival of probiotics in food matrix under simulated stress conditions. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(9), 103394. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103394>
- AGROCALIDAD. (2022). *Manual Técnico para el Registro y Control de Fertilizantes, Enmiendas de Suelo y Productos Afines de Uso Agrícola (Edición No. 7)*. Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario, Quito, Ecuador.
- Aktar, M. W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Toxicología Interdisciplinaria*, 2(1), 1-12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Alonso, M. L. (2011). *MICROENCAPSULACIÓN DE BIOCIDAS*. <http://hdl.handle.net/10810/6944>
- Aramendis, R., Mondaini, A., & Rodríguez, A. (2023). *Bioinsumos de uso agrícola: situación y perspectivas en América Latina y el Caribe (No. 68714)*. Santiago: Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL).
- Arcudia Hernández, C. E., Martínez Padrón, A. D., & Martínez Alvarado, E. (2025). REGULATORY FRAMEWORK FOR BIOINPUTS IN ORGANIC AGRICULTURE IN MEXICO. *TLATEMOANI. Revista Académica de Investigación*, 16(50), 1989-9300.
- Baranyi, J., Rockaya, M., & Ellouze, M. (2024). From data to models and predictions in food microbiology. *Current Opinion in Food Science*, 57, 2214-7993. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cofs.2024.101177>
- Bashan, Y., Bashan, L. E., Prabhu, S., & Hernández, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, 378, 1-33. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- Benítez, S. V., Carrasco, R., Giraldo, J. D., & Schoebitz, M. (2024). Microbeads as carriers for *Bacillus pumilus*: a biofertilizer focus on auxin production. *J Microencapsul*, 41(3), 170-

189. <https://doi.org/10.1080/02652048.2024.2324812>
- Bevilacqua, A., Speranza, B., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2015). A Focus on the Death Kinetics in Predictive Microbiology: Benefits and Limits of the Most Important Models and Some Tools Dealing with Their Application in Foods. *Foods*, 4(4), 565-580. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/foods4040565>
- Cabrera-Verdezoto, R. P., Zambrano-Molina, J. D., Maytin-Fumero, C., & Vélez-Sánchez, A. B. (2023). The influence of soil microbiota on agricultural yield, a scientific analysis. *Innova Science Journal*, 1(4), 13-24. <https://doi.org/https://doi.org/10.63618/omd/isj/v1/n4/24>
- Calderón-Oliver, M., & Ponce-Alquicira, E. (2022). The Role of Microencapsulation in Food Application. *Molecules*, 27(5), 1499. <https://doi.org/10.3390/molecules27051499>
- Cardona-Tangarife, D. P., Patiño-Arias, L. P., & Ormaza-Zapata, A. M. (2021). Aspectos tecnológicos de la microencapsulación de compuestos bioactivos en alimentos mediante secado por aspersión. in *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 22(1), 1-21. https://doi.org/https://doi.org/10.21930/rcta.vol22_num1_art:1899
- Cid, R. (2014). Capítulo 2: PLAGUICIDAS QUÍMICOS, COMPOSICIÓN Y FORMULACIONES, ETIQUETADO, CLASIFICACIÓN TOXICOLÓGICA, RESIDUOS Y MÉTODOS DE APLICACIÓN. En *APLICACIÓN EFICIENTE DE FITOSANITARIOS*. (págs. 1-14). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Córdova-Pogo, M. A. (2025). *Universidad Central del Ecuador*. <https://www.dspace.uce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/0aeef88-367b-46d9-9d11-b8fbfdc28e6f/content>
- Crespo-Avila, J. A. (2025). *Agroecología Viva Ciencia, Técnicas y Bioinsumos para la Producción Sostenible en*. CID-Centro de Investigación y Desarrollo. https://doi.org/https://doi.org/10.37811/cli_w1244
- DE LA CRUZ-GONZÁLEZ, M. Y. (2020). [https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/DE%20LA%20CRUZ%20GONZALEZ%20MARC Y%20YOMIRA_compressed\(1\).pdf](https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/DE%20LA%20CRUZ%20GONZALEZ%20MARC%20YOMIRA_compressed(1).pdf)

- del Puerto Rodríguez, A. M., Suárez Tamayo, S., & Palacio Estrada, D. E. (2014). Effects of pesticides on health and the environment. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372-387. <https://doi.org/https://www.redalyc.org/pdf/2232/223240764010.pdf>
- Dewi, S., Kamil, R. Z., Yumnarningsih, H., & Abduh, S. M. (2025). Effect of calcium lactate concentrations on morphology and efficiency of encapsulated probiotics in orange juice. *Asia -Pacific Journal of Science and Technology*, 30(05), APST-30. <https://doi.org/https://doi.org/10.14456/apst.2025.69>
- Erazo, N., Rosero, G., & Álvarez, P. (2026). Uso de microorganismos en el manejo sostenible de los suelos. *in Siembra*, 13(3). [https://doi.org/10.29166/siembra.v13i3\(Especial\).9594](https://doi.org/10.29166/siembra.v13i3(Especial).9594)
- Ethica, S. N., Haryanto, H., Ernanto, A. R., Rahajoe, T., Sulistyaningtyas, A. R., & Sabdono, A. (2025). Development and Application of Hydrolytic Bacterial Microcapsules as Bioremediation Agent of Hospital Wastewater — A Case Report in Semarang. *IJESD*, 16(1), 7-15. <https://doi.org/10.18178/ijesd.2025.16.1.1505>
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285, 44-55.
- Frent, O. D., Vicas, L. G., Duteanu, N., Morgovan, C. M., Jurca, T., Pallag, A., . . . Marian, E. (2022). Sodium Alginate—Natural Microencapsulation Material of Polymeric Microparticles. *International journal of molecular sciences*, 23(20), 12108. <https://doi.org/10.3390/ijms232012108>
- Gil, M. M., Miller, F. A., Brandao, T. R., & Silva, C. L. (2011). On the Use of the Gompertz Model to Predict Microbial Thermal Inactivation Under Isothermal and Non-Isothermal Conditions. *Food Engineering Reviews*, 3(1), 17-25.
- González Sánchez, A. (2023). *Economía circular y el sector agroalimentario*. <http://hdl.handle.net/2183/36589>
- Guerrero, L. S. (2021). *Interacción de nuevas especies microbianas PGPR y fertilizantes con el cultivo de*.
- Guevara-Bretón, N. A., & Jiménez-Munguía, M. T. (2008). Materiales utilizados en la

- encapsulación. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 2, 22-27.
<https://www.udlap.mx/TSIA/assets/files/volumen2-1/TSIA-Vol2-No1-Guevara-Breton-et-al-2008a.pdf>
- Guo, S., Lu, C., Wang, K., Wang, J., Zhang, Z., Liu, H., . . . Zhang, Q. (2022). Effect of citrate buffer on hydrogen production by photosynthetic bacteria. *Bioresource Technology*, 347, 126636.
- Harrison, P. (2002). *Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. Informe resumido*. FAO.
- Hernández Mendoza, J. L., Hinojosa López, P. L., Salazar Bravo, Á., García Olivares, J. G., Rodríguez Castillejos, G. C., & Quiroz Velásquez, J. D. (2018). CONSERVACIÓN POR MICROENCAPSULACIÓN DE BACTERIAS DE USO AGRÍCOLA: AZOSPIRILLUM BRASILENSE. *Revista Boliviana de Química*, 35(4), 117-122.
- Hernández-Martínez, R., García-Aguado, L. R., & Rico-Ramírez, M. V. (2022). Encapsulación en perlas de alginato de bacterias promotoras de crecimiento vegetal aisladas de áreas naturales protegidas. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 16, 1-9.
- Hiura, S., Abe, H., Koyama, K., & Koseki, S. (2020). Transforming kinetic model into a stochastic inactivation model: Statistical evaluation of stochastic inactivation of individual cells in a bacterial population. *Food Microbiology*, 91.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103508>
- Jang, S., Choi, S. K., Zhang, H., Zhang, S., Ryu, C. M., & Kloepper, J. W. (2023). History of a model plant growth-promoting rhizobacterium, *Bacillus velezensis* GB03: from isolation to commercialization. *Frontiers in plant science*, 14, 1279896.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1279896>
- Loera-Muro, A., & Caamal-Chan, M. G. (2023). Biopelículas en la rizósfera y su papel en la producción de compuestos antimicrobiales en el suelo. *Terra Latinoamericana*, 41, e1733. <https://doi.org/https://doi.org/10.28940/terra.v41i0.1733>
- Lucas, J., & Llerena, L. (2024). *Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes en el cultivo del arroz (Oryza sativa L.)*. Ecuador: Universidad Técnica Estatal de Quevedo. <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/7212>

- Mamani de Marchese, A., & Filippone, M. P. (2018). Bio-products: key components of sustainable agriculture. *Revista agronómica del noroeste argentino*, 38(1), 9-21.
- Martin, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2013). Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. *LWT - Food Science and Technology*, 53(2), 480-486. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.03.019>
- Montoya-Arango, D., Quintero-Rodriguez, M. P., Restrepo-Posada, D. C., & González-Gil, D. M. (2023). Evaluación de la viabilidad, estabilidad y pureza post liofilización en diferentes modelos fúngicos de la Colección de Microorganismos de la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia, Colombia. *Revista Bionatura*, 8(4), 1-12. <https://doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.22>
- Moradi Pour, M., Saberi Riseh, R., & Skorik, Y. (2022). Sodium Alginate–Gelatin Nanoformulations for Encapsulation of *Bacillus velezensis* and Their Use for Biological Control of Pistachio Gummosis. *Materials (Basel, Switzerland)*, 15(6), 2114. <https://doi.org/10.3390/ma15062114>
- MOSQUERA-VIVAS, E. S., AYALA-APONTE, A. A., & SERNA-COCK, L. (2024). Importancia de la encapsulación de probióticos: gelificación iónica y coacervación compleja como técnicas prometedoras para uso alimentario. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 22(1), 105-123. <https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.18684/rbsaa.v22.n1.2024.2223>
- Murthy, S., Murugan, R., Ramesh, M., Sakthivel, S., & KR, K. (2025). Formulation and Characterization of Encapsulated *Bacillus* spp. for Enhanced Agro-Industrial Efficacy. *International Journal of Innovative Science and Research Technology*, 10(9), 1513-1516. <https://doi.org/https://doi.org/10.38124/ijisrt/25sep896>
- Niño-Vásquez, I. A., Muñoz-Márquez, D., Ascacio-Valdés, J. A., Contreras-Esquivel, J. C., Aguilar, C. N., Rodríguez-Herrera, R., & Flores-Gallegos, A. C. (2022). Co-microencapsulación: una técnica multi-enfoque prometedora para la mejora de las propiedades funcionales. *Bioengineered*, 13(3), 5168–5189.

<https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2037363>

- Ortiz-Romero, N., Ochoa-Martínez, L. A., González-Herrera, S. M., Rutiaga-Quiñones, O. M., & Gallegos-Infante, J. A. (2021). Advances in Research into Encapsulation through Ionic Gelation: A Systematic Review. *TecnoLógicas*, 24(52), e1962. <https://doi.org/https://doi.org/10.22430/22565337.1962>
- Ostos-Ortíz, O. L., Rosas-Arango, S. M., & González-Devia, J. L. (2019). Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos. *Nova*, 17(31), 129-163.
- Pedreño, J. N., Herrero, M., Lucas, G., & Beneyto, M. (1995). *RESIDUOS ORGÁNICOS*. Universidad de Alicante. https://www.researchgate.net/profile/Jose-Navarro-Pedreno/publication/235941169_Residuos_organicos_y_agricultura/links/02e7e515e8998b0bdb000000/Residuos-organicos-y-agricultura.pdf
- Perez-Palacios, T., Ruiz-Carrascal, J., Solomando, J. C., de la Haba, F., Pajuelo, A., & Atenuera, T. (2022). Recent Developments in the Microencapsulation of Fish Oil and Natural Extracts: Procedure, Quality Evaluation and Food Enrichment. *Foods*, 11(20), 3291. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/foods11203291>
- Rabbee, M. F., Ali, M. S., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K. H. (2019). *Bacillus velezensis*: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(6), 1046. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules24061046>
- Rai, P. K., Rai, A., Sharma, N. K., Singh, T., & Kumar, Y. (2023). Limitations of biofertilizers and their revitalization through nanotechnology. *Journal of Cleaner Production*, 418, 138194. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.138194>
- Reyna, E. N., Álvarez, G. M., Iliná, A., & Hernández, J. M. (2015). Microencapsulación de componentes bioactivos. *Investigación y Ciencia*, 23(66), 64-70.
- Rodríguez Aristizabal, M. A., & Lugo Ramírez, M. C. (2023). ESTADO ACTUAL DEL USO DE BIOINSUMOS MICROBIANOS EN COLOMBIA. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 39(3), 444-456. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.29393/chjaa39-39eamm20039>

- Saberi Riseh, R., Skorik, Y. A., Thakur, V. K., Moradi Pour, M., Tamanadar, E., & Noghabi, S. S. (2021). Encapsulation of Plant Biocontrol Bacteria with Alginate as a Main Polymer Material. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11165. <https://doi.org/10.3390/ijms222011165>
- Sawatphanit, N., Sutthisa, W., & Kumlung, T. (2022). Bioformulation Development of *Bacillus velezensis* Strain N1 to Control Rice Bacterial Leaf Blight. *Trends in Sciences*, 19(21), 6315. <https://doi.org/https://doi.org/10.48048/tis.2022.6315>
- Singh, M., Jha, S., Pathak, D., & Maisnam, G. (2025). Advancing biofertilizers: the evolution from single-strain formulations to synthetic microbial communities (SynCom) for sustainable agriculture. *Discover Plants*, 2(226). <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s44372-025-00318-w>
- Sola-Montilla, M. (2023). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. (Jaén, Ed.) Retrieved Febrero 2026, from <https://crea.ujaen.es/server/api/core/bitstreams/a1b2bd26-cafe-40c7-b5fd-8ac16b1b53c4/content>
- Soria, N. W. (2026). Desafíos principales en el desarrollo de productos biológicos para una agricultura ecosustentable. *Methodo Investigación Aplicada a Las Ciencias Biológicas*, 11(1), 01-03. [https://doi.org/https://doi.org/10.22529/me.2026.11\(1\)01](https://doi.org/https://doi.org/10.22529/me.2026.11(1)01)
- Suárez, M., & Brito, C. (2020). EFICIENCIA DE ENCAPSULACION Y CAPACIDAD DE CARGA DE ANTOCIANINAS DE *Vaccinium floribundum* Kunt EN NANOPARTICULAS DE ZEINA. *infoANALÍTICA*, 8(1), 83-97. <https://doi.org/https://doi.org/10.26807/ia.v8i1.98>
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1-2), 47-55. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00380-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00380-9)
- Szpicer, A., Bińkowska, W., Stelmasiak, A., Wojtasik-Kalinowska, I., Czajkowska, A.,

- Mierzejewska, S., . . . Póltorak, A. (2025). Innovative Microencapsulation Techniques of Bioactive Compounds: Impact on Physicochemical and Sensory Properties of Food Products and Industrial Applications. *Applied Sciences*, 15(22), 11908. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/app152211908>
- van Boekel, M. A. (2002). On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1-2), 139-159. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00742-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00742-5)
- Velloso, C., Lopes, M., Badino, A., & Farinas, C. (2023). Exploring the roles of starch for microbial encapsulation through a systematic mapping review. *Carbohydrate Polymers*, 306, 120574. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120574>
- Vieira Velloso, C. C. (2024). *Novas abordagens para aumentar a sobrevivência e eficiência de cepas de Bacillus solubilizadoras de fosfato*. <https://repositorio.ufscar.br/server/api/core/bitstreams/74b48356-50cb-46aa-b103-4bd5ed2586ec/content#32#12>
- Viera-Arroyo, W. F. (2020). Role of beneficial microorganisms in Sustainable Agriculture. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 67-68. <https://doi.org/https://doi.org/10.36610/j.jsab.2020.080200067>
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & Santos-Villalobos, S. (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/https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Wang, K., Zhou, W., Zhai, J., Du, P., Liu, L., Li, S., & Li, A. (2024). Diversified modification strategies for sodium alginate-based probiotic-embedded gels and their potential for food applications. *Food Science of Animal Products*, 2(4), 9240090. <https://doi.org/https://www.sciopen.com/article/10.26599/FSAP.2024.9240090>
- Wang, X., Gao, S., Yun, S., Zhang, M., Peng, L., Li, Y., & Zhou, Y. (2022). Microencapsulating Alginate-Based Polymers for Probiotics Delivery Systems and Their Application. *Pharmaceuticals (Basel)*, 15(5), 644. <https://doi.org/10.3390/ph15050644>

- Wekesa, T. B., Wekesa, V. W., Onguso, J. M., Wafula, E. N., & Kavesu, N. (2022). Isolation and Characterization of *Bacillus velezensis* from Lake Bogoria as a Potential Biocontrol of *Fusarium solani* in *Phaseolus vulgaris* L. *Bacteria*, 1(4), 279-293.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/bacteria1040021>
- Zhong, X., Jin, Y., Ren, H., Hong, T., Zheng, J., Fan, W., . . . Huang, G. (2024). Research progress of *Bacillus velezensis* in plant disease resistance and growth promotion. *Frontiers Industrial Microbiology*, 2(1442980).
<https://doi.org/https://doi.org/10.3389/finmi.2024.1442980>

Anexos

Anexo A. Registro fotográfico de las microcápsulas obtenidas para los dos tratamientos.

A1. Evidencia fotográfica de las microcápsulas formadas correspondientes al Tratamiento 1:

Alginato de sodio 1% + Almidón 0.5%

		
T1R1	T1R2	T1R3
		
T1R4	T1R5	T1R6

A2. Evidencia fotográfica de las microcápsulas formadas correspondientes al Tratamiento 2:

Alginato de sodio 1.5% + Almidón 0.5%

		
T2R1	T2R2	T2R3

		
T2R4	T2R5	T2R6

Nota. Las microcápsulas fueron observadas haciendo uso de un estereomicroscopio.