

Encapsulación en perlas de alginato de bacterias promotoras de crecimiento vegetal aisladas de áreas naturales protegidas

Ricardo Hernández-Martínez¹, Luis Ricardo García-Aguado¹, Mayela Vianey Rico-Ramírez¹, Vicente Peña-Caballero¹, Blanca Estela Gómez Luna¹

¹Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Ingeniería en Biotecnología
r.hernandez.m@ugto.mx¹, lr.garciaaguado@ugto.mx¹, mv.ricoramirez@ugto.mx¹, vicente.caballero@ugto.mx¹, be.gomez@ugto.mx¹

Resumen

La formulación de portadores de inoculantes en la elaboración de biofertilizantes es sustancial debido a que en esta labor es donde se convierte un microorganismo prometedor probado en laboratorio en un producto de campo comercial. En el presente trabajo se muestran los primeros resultados dentro de la implementación de un protocolo de encapsulación de una cepa bacteriana perteneciente al grupo de las denominadas bacterias promotoras de crecimiento vegetal, aislada del área natural protegida “El cerro del Culiacán”, utilizando alginato como vehículo. Se determinó que con el protocolo implementado, las perlas de alginato producidas poseían una geometría esférica y aparentemente lisa en las cuales se podía observar la presencia de colonias bacterianas. También, se obtuvo una eficiencia de encapsulamiento del 95.7 % del material biológico y, además, se logró identificar que existía la presencia de la especie de interés dentro del encapsulado. El método descrito en este estudio demuestra una buena eficiencia de encapsulamiento, del cual se espera buscar mejoras en el proceso, añadiendo y/o modificando variables para obtener una futura estandarización con el objetivo de emplear estas cápsulas en suelos agrícolas.

Palabras clave: biofertilizantes; rizobacterias.

Introducción

Fertilizantes y agroquímicos

La aplicación y uso de fertilizantes y agroquímicos en la agricultura han ayudado a incrementar de manera significativa la producción de los cultivos en tierras cultivables, pero a pesar de estos beneficios, las malas prácticas, tales como el uso excesivo de estos componentes, han dado como resultado daños responsables del deterioro en el medio ambiente y demás sectores.

En naciones en desarrollo, los métodos agrícolas siguen prácticas insostenibles que han resultado en una gran cantidad de efluentes tóxicos que se emiten directa o indirectamente al suelo, aire y agua. En la actualidad, varios agroquímicos (fertilizantes químicos, herbicidas, fungicidas, insecticidas, etc.) se están utilizando de manera no juiciosa (Meena *et al.*, 2020) y, además, los fertilizantes químicos son costosos, afectan el suelo, reducen su capacidad de retención de agua y su fertilidad, provocan un desequilibrio en los nutrientes del suelo y dan como resultado niveles inaceptables de contaminación del agua (Nosheen *et al.*, 2021). Por dichas razones, en las últimas décadas se han explorado alternativas para estos productos, buscando dar soluciones a las problemáticas relacionadas con estos, y es aquí en donde encontramos el desarrollo de los biofertilizantes.

Biofertilizantes

Un biofertilizante se define más comúnmente como “una sustancia que contiene microorganismos vivos que, cuando se aplica a semillas, superficies de plantas o suelo, coloniza la rizosfera o el interior de la planta y promueve el crecimiento al aumentar el suministro o la disponibilidad de nutrientes primarios para la planta huésped” (Basu *et al.*, 2021). Los biofertilizantes son ecológicos, rentables, no tóxicos y fáciles de aplicar; ayudan a mantener la estructura del suelo y la biodiversidad de los suelos agrícolas; por lo tanto, sirven como un buen sustituto de los fertilizantes químicos (Nosheen *et al.*, 2021).

Lo anterior ha propiciado el uso de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (MPCV) (donde destacan los géneros bacterianos *Rhizobium*, *Bacillus* y *Pseudomonas*) como ingredientes activos de los biofertilizantes, cuyos bioformulados que contienen microorganismos vivos, al ser aplicados de manera foliar, en riego o al suelo, promueven el desarrollo de las plantas a través de mecanismos directos e indirectos (Chávez-Díaz *et al.*, 2020).

Los MPCV son microorganismos habitantes en la rizosfera de las plantas que se distinguen por su capacidad de favorecer el desarrollo y crecimiento de las plantas, tal como su nombre lo indica. Estos microorganismos pueden estimular directamente el crecimiento de las plantas al aumentar la eliminación de nutrientes del suelo, como la fijación de nitrógeno atmosférico, la solubilización de minerales de fósforo y hierro, la producción de sideróforos y enzimas, la inducción y producción de reguladores del crecimiento de las plantas y la activación de mecanismos de resistencia inducida en las plantas (Benaissa, 2019).

Los mecanismos de acción se clasifican como directos e indirectos (Figura 1). Los directos mejoran el estado nutricional de la planta al incrementar el volumen de exploración y funcionalidad de las raíces, captación de agua, disponibilidad y absorción de nutrientes y la fisiología de toda la planta; por otra parte, los indirectos están involucrados en la protección contra el estrés ocasionado por factores abióticos y bióticos, entre los que destacan la inducción de resistencia a condiciones ambientales adversas y a fitopatógenos (Chávez-Díaz *et al.*, 2020).

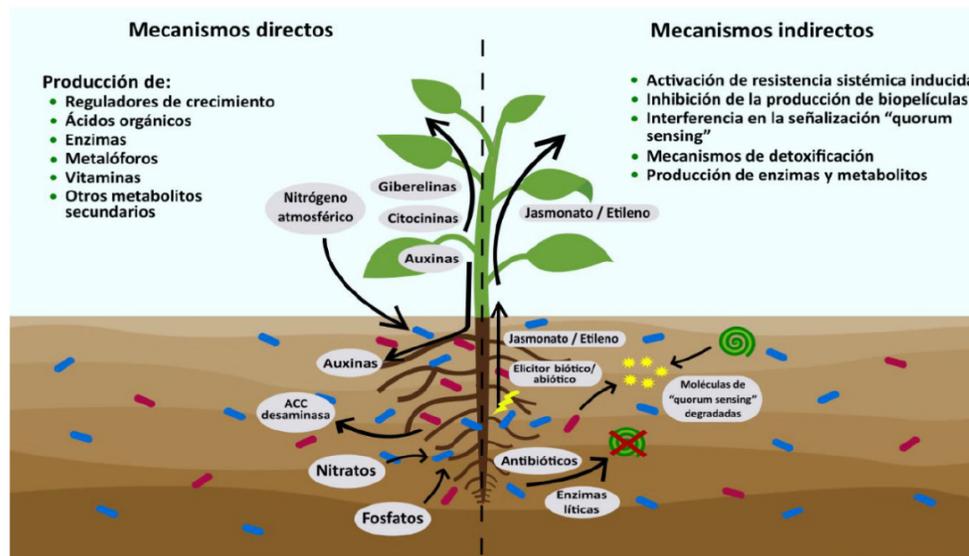


Figura 1. Mecanismos directos e indirectos presentes en microorganismos promotores del crecimiento vegetal (MPCV).
Fuente: (Chávez-Díaz *et al.*, 2020)

Existen ciertos factores que determinan el éxito de la producción y aplicación de los biofertilizantes sobre los cultivos, de los cuales, podemos destacar los siguientes de acuerdo con Chávez-Díaz *et al.* (2020): a) El biofertilizante debe de contener una carga viable de la cepa reportada como ingrediente activo, ya que un número excesivo o limitado de estas puede dificultar la germinación de la semilla o el crecimiento de la planta respectivamente, b) Debe de estar libre de microorganismos contaminantes y c) El tipo de portador de inoculante, soporte o acarreador, quien determina la vida útil del producto y la persistencia de sus microorganismos durante la fenología del cultivo o en la etapa de interés para su efecto benéfico.

Con respecto al último factor mencionado, la formulación de portadores de inoculantes, soportes o acarreadores es de suma importancia debido a que en esta labor es donde se convierte un microorganismo prometedor probado previamente en laboratorio en un producto de campo comercial. Dentro de las tecnologías existentes para la elaboración de portadores de inoculantes encontramos a la encapsulación bacteriana; Esta técnica se ha utilizado en agricultura para obtener una manera de usar a estos microorganismos como biofertilizantes, debido a que permite protegerlos del entorno del suelo hostil, reducir la competencia microbiana y liberarlos gradualmente para facilitar la colonización de las raíces de las plantas (Young *et al.*, 2006).

Encapsulación bacteriana

De acuerdo con Hernández-Mendoza *et al.* (2018), la encapsulación es una tecnología de empaquetamiento de sustancias químicas y materiales biológicos, que está conformada por partículas con una membrana polimérica que faculty el aislamiento físico y proporciona protección contra factores medioambientales o fisicoquímicos del suelo, permitiendo la liberación gradual del agente encapsulado; además, estas microcápsulas ofrecen la posibilidad de recuperar el agente, ya que constituye un microentorno interno adecuado para las bacterias.

Se han utilizado numerosos materiales y métodos para producir biofertilizantes encapsulados, con componentes que incluyen talco, vermiculita, perlita, poliácridamida, carragenina, alginato de sodio (ALG), ALG-almidón, ALG-ácido húmico en forma de polvo, turbas, líquidos y arcillas (Saber-Riseh *et al.*, 2021). El tipo de componente a usar debe tener ciertas características que le permitan ser adecuado para su uso. La protección para MPCV debe ser no tóxica, capaz de degradarse en el suelo por acción microbiana y resistente a los factores ambientales destructivos presentes en el suelo, mantener la viabilidad celular y permitir la liberación progresiva de los microorganismos encapsulados en el suelo (Saber-Riseh *et al.*, 2021). Entre todos los materiales utilizados, el alginato se considera el polímero experimental más común en la agricultura (Meftah-Kadmiri *et al.*, 2021).

El alginato ha sido uno de los polímeros más utilizado en la encapsulación, pues forma una matriz altamente versátil, biocompatible y no tóxica para los componentes activos, células o microorganismos sensibles al calor, pH, oxígeno y luz, entre otros factores (Hernández-Mendoza *et al.*, 2018). Además, se ha demostrado que las perlas de alginato son capaces de atrapar un número suficiente de bacterias en los procesos de encapsulación (Young *et al.*, 2006). De acuerdo con Pasin *et al.* (2012), el alginato es descrito como un polisacárido lineal poliiónico e hidrofílico proveniente de algas marinas conformado por dos monómeros en su estructura, el ácido α -L-gulurónico (G) y el ácido β -D-manurónico (M) que se distribuyen en secciones constituyendo homopolímeros tipo G-bloques (-GGG-), M-bloques (-MMM-) o heteropolímeros donde los bloques M y G se alternan (-MGMG-).

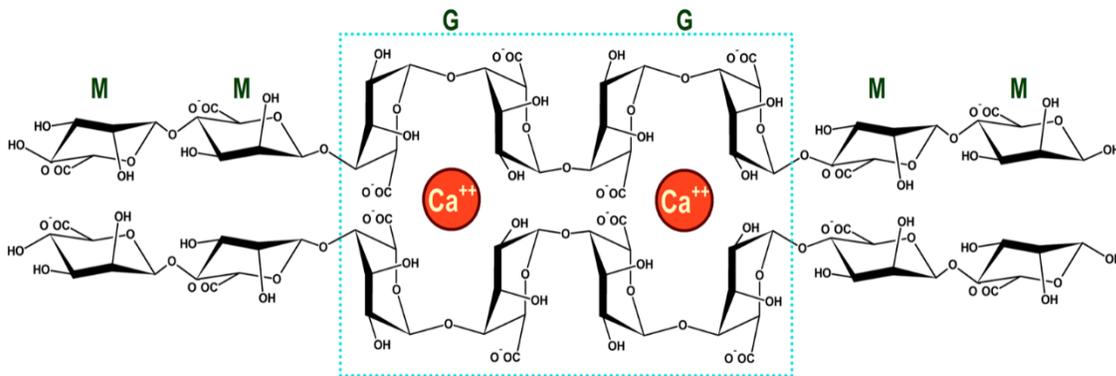


Figura 2. Esquema de la estructura de "caja de huevo" en hidrogel de alginato reticulado con iones de calcio.
Fuente: (Lee *et al.*, 2019)

El proceso de formación del gel se inicia a partir de una solución de sal de alginato y una fuente de calcio externa o interna desde donde el ion calcio se difunde hasta alcanzar la cadena polimérica, como consecuencia de esta unión se produce un reordenamiento estructural en el espacio resultando en un material sólido con las características de un gel (Pasin *et al.*, 2012). Para formar el encapsulado, la solución de alginato y el cultivo de células microbianas se mezclan y luego se extruden en una solución de cloruro de calcio (CaCl_2), en donde las gotitas formadas luego se lavan y se secan para producir biofertilizantes encapsulados en alginato; Esta técnica tiene la ventaja de su excelente estabilidad y, en consecuencia, parece ser un método conveniente para la encapsulación de células (Meftah-Kadmiri *et al.*, 2021).

Bacterias promotoras de crecimiento vegetal aisladas de áreas naturales protegidas

La identificación de MPCV, en específico de cepas bacterianas pertenecientes a las denominadas bacterias promotoras de crecimiento vegetal PGPR (por sus siglas en inglés, *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) es de suma importancia en el desarrollo de biofertilizantes, debido a que estas tienen el potencial de convertirse en el material activo presente en los encapsulados. Este tipo de bacterias abundan en suelo de las Áreas Naturales Protegidas (ANP), las cuales son zonas del territorio nacional sobre las que la nación ejerce su soberanía y jurisdicción, siendo ambientes originales que no han sido significativamente alterados por actividades humanas o que requieren ser preservadas y/o restauradas (Mosqueda-Arreguin *et al.*, 2018). El estado de Guanajuato cuenta con 23 ANP estatales, 6 ANP municipales y 3 ANP federales, representadas en la siguiente figura (Figura 3).

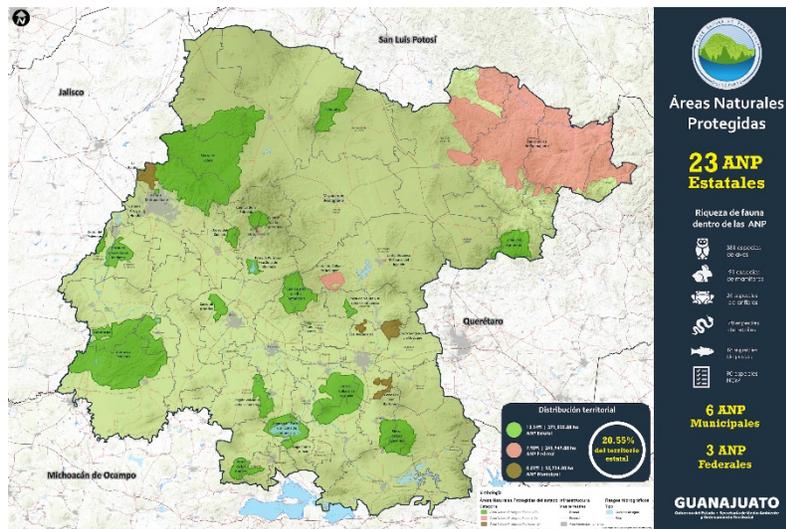


Figura 3. Mapa de las Áreas Naturales Protegidas de Guanajuato.
Fuente: (SMAOT, 2020)

Las ANP tienen ese potencial de ser un recurso científico explotable, ya que mantienen dinámicas biológicas estables y los suelos de estos ecosistemas poseen una gran diversidad de microorganismos que pueden ser una amplia fuente de material biológico para poder ser utilizados en la mejora de la producción vegetal como estrategia biotecnológica a través del desarrollo de biofertilizantes.

En la presente investigación, el material biológico de interés utilizado fue una cepa bacteriana (denominada como "275") proveniente de una colección aislada de muestras de suelo tomadas en la zona radical de árboles de encino (*Quercus rugosa*) perteneciente al área natural protegida "El cerro del Culiacán" del estado de Guanajuato (Coordenadas 20°22' 00" latitud norte, 100°55' 00" longitud oeste y altitud sobre el nivel del mar de 2,830 metros). Esta cepa se investigó previamente para determinar los rasgos aparentes que promueven el crecimiento de las plantas. La cepa 275 presenta buenos porcentajes de germinación y promoción de crecimiento de plantas de rábano (*Raphanus sativus*) (Martín-Aguilar *et al.*, 2018), también se identificó que mejora el porcentaje de germinación y desarrollo de la planta en huisache (*Acacia farnesiana*) y lenteja (*Lens culinaris*) (Galindo-Rocha & Gómez-Luna, 2019).



Figura 4. Tinción de Gram. Cepa "275" utilizada en el presente estudio.

La labor de identificar material biológico prometedor que ayude en la mejora de la producción vegetal es de los primeros pasos de una larga serie de procedimientos para el desarrollo de productos alternativos; este estudio partió de una previa identificación del material biológico promisorio para adentrarse en el desarrollo de un protocolo estandarizado para la encapsulación de estos microorganismos, siendo este una tarea desafiante, ya que el producto debe ser estable para su almacenamiento y labores de transporte, fácil de manejar y aplicar por los agricultores, ser rentable, efectivo, práctico y mejorar o mantener la actividad del organismo en el campo.

El presente artículo demuestra la implementación de un protocolo de encapsulación de PGPR utilizando alginato como vehículo para su posterior estandarización (haciendo hincapié en ello) buscando mejoras en el proceso. En esta etapa del estudio se determinó la eficiencia de encapsulamiento y la corroboración cualitativa del material biológico en el encapsulado.

Materiales y métodos

El presente estudio se realizó en el laboratorio de investigación de la Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra de la sede Mutualismo.

Alginato y soluciones

Se adquirió alginato de sodio puro de Química Suastes, S.A. de C.V. REACTIVOS MEYER, Ciudad de México, México. La solución de alginato (2% p/v) se preparó disolviendo el polvo en agua destilada con agitación usando un agitador magnético, calentando la solución con una parrilla de calentamiento hasta que la solución se homogeneizó. Se adquirió CaCl_2 dehidratado de Karal S.A. de C.V., León, México. La solución de CaCl_2 (1% p/v) se preparó disolviendo el polvo en agua destilada a temperatura ambiente con agitación manual. Se preparó agua peptonada (0.1% v/v), con Peptona de caseína "M" siguiendo las especificaciones del proveedor, adquirida de Microbiología Aplicada SOLBIOSA, Guadalajara, México. También se preparó glicerol (50% v/v) y utilizó agua destilada. Todas las soluciones fueron posteriormente esterilizadas en autoclave a 15 lb a 121 °C por 15 min.

Cepa bacteriana a encapsular, crecimiento y condiciones de cultivo

La cepa bacteriana "275" se cultivó en medio de caldo papa dextrosa que contenía extracto de papa (200 g de papa se hierven por 20 min por l de agua purificada de garrafón) y 5 g de dextrosa por l de agua purificada de garrafón y se incubó a 27°C durante 48 h en un agitador orbital (200 rpm). Las células se recogieron por centrifugación (29°C, 6000 rpm, 30 min) a una densidad celular de 1.4×10^4 UFC/mL. Se realizaron dos lavados del pellet por inmersión con agua destilada estéril y finalmente este se resuspendió en agua peptonada (0.1% v/v) estéril.

Formación de perlas de alginato

Además de las soluciones preparadas, todo el material utilizado fue esterilizado a 15 lb por 121 °C por 15 min. Se añadieron las células bacterianas resuspendidas en agua peptonada a la solución de alginato de sodio estéril y se agitó usando un agitador magnético. Esta suspensión se extruyó a través de una manguera (Masterflex C-FLEX N. L/S # 14 con un diámetro de 1/16 pulgadas) por goteo haciendo uso de una bomba peristáltica (MasterFlex) a un caudal volumétrico de 1 mL/min a la solución de CaCl₂ a una distancia manguera/solución de 3±1 cm, todo esto a temperatura ambiente en agitación suave. Las perlas formadas se dejaron endurecer en la solución durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las perlas se cosecharon filtrándolas, haciendo uso de una gasa estéril. Una vez filtradas, se añadieron a un matraz con caldo papa dextrosa y se incubaron en agitador orbital (200 rpm, 27° C, 48 h). Terminado el tiempo de incubación se filtraron nuevamente y las perlas fueron recuperadas. Finalmente, para su almacenamiento y uso en futuras investigaciones, las perlas se vertieron en una solución (1:1) de glicerol (50% v/v) y caldo papa dextrosa estériles y se congelaron a -15 °C.

Determinación del porcentaje de eficiencia de encapsulación

Se realizó la determinación del número total de bacterias a encapsular y sin encapsular por el método estándar de recuento en placa después de la incubación a 29 °C durante 24 h. Con estos datos se calculó la eficiencia de encapsulación en porcentaje (EE %) con la siguiente fórmula:

$$EE (\%) = (A-B) / A \times 100$$

Donde A es la concentración bacteriana total en la suspensión a encapsular y B es la concentración de la bacteria sin encapsular encontrada en el sobrenadante.

Análisis de la morfología de las perlas de alginato

Para la determinación morfológica de las perlas formadas, estas fueron observadas haciendo uso de un microscopio estereoscópico para poder apreciar con mayor detalle la forma tridimensional de las perlas formadas.

Identificación de la bacteria encapsulada en las perlas de alginato

Para corroborar que existía la presencia de la bacteria en el encapsulado, se tomó una de las perlas formadas, la cual se resuspendió en 400 µl de agua destilada estéril hasta su homogeneización. Posteriormente, se tomó una muestra, se realizó tinción Gram y observó al microscopio óptico.

Resultados y discusiones

Con respecto al porcentaje de la eficiencia de encapsulación, se determinó que la concentración bacteriana total en la suspensión a encapsular después del proceso de cosecha de la bacteria y antes de la encapsulación fue de 3.5x10³ UFC/mL. Por otra parte, la concentración de la bacteria sin encapsular encontrada en el sobrenadante al momento de recuperar las perlas formadas en la solución de CaCl₂ estéril fue de 1.5x10² UFC/mL. Con estos datos se determinó que el porcentaje de la eficiencia de encapsulación (EE %) tuvo un valor del 95.7 %. Este dato hace sentido a lo reportado en la literatura, quienes indican que las perlas de alginato son capaces de atrapar un número suficiente de bacterias en los procesos de encapsulación. Los autores Défaz & Moreira (2017), obtuvieron un porcentaje de eficiencia de encapsulación del 76% en la encapsulación de *L. plantarum* utilizando alginato de sodio al 2% (p/v) extruyendo la solución usando una jeringa con una aguja de diámetro 0.7 mm mediante goteo a 100 mL de CaCl₂ a 100 mM con una velocidad de goteo promedio de 2.89887 cápsulas/segundo. Por otra parte, González-Cuello et al. (2015) obtuvieron una eficiencia en la microencapsulación de *L. delbrueckii* del 98.7 %, utilizando la mezcla binaria de alginato de sodio y goma gelana de alto acilo con un 0.2 % (v/v) de surfactante bajo agitación constante (400 rpm). Este alto valor del porcentaje de encapsulación es debido a la incorporación de la goma galana de acilo, ya que esta recubre los poros presentes en las cápsulas, aumentando la eficiencia en la

encapsulación (Ortiz-Romero et al., 2021). Como se puede identificar, cambios en la técnica y/o adición de diferentes parámetros modifican los porcentajes de la eficiencia de encapsulación bacteriana en cada estudio.

Acerca del análisis y la morfología de las perlas de alginato formadas, la geometría de las cápsulas fue de manera general esférica, con aparente superficie lisa y uniforme (con un tamaño y peso por definirse) como se puede observar en (a) de la Figura 5. De acuerdo con Hernández-Mendoza et al. (2018), la concentración de alginato es importante en la formación de las cápsulas, ya que en concentraciones bajas a 2% (p/v) no se consolidan y al filtrarlas quedan adheridas al papel filtro como una película delgada, además, el pH aparentemente no tiene efecto en la formación de las cápsulas. Otros parámetros a tener en cuenta es la técnica de extrudir la solución de alginato y células a la solución de CaCl_2 . De acuerdo con Smrdel et al. (2008), la forma de las perlas está influenciada por la distancia entre la parte superior de la aguja/ manguera, a través de la cual se deja caer la dispersión a la solución de endurecimiento, así como la velocidad de agitación de la solución de endurecimiento; Encontraron en su estudio que las perlas se aplanaban al contacto con el medio endurecedor si la dispersión de alginato se dejaba caer desde una altura superior a 6 cm.

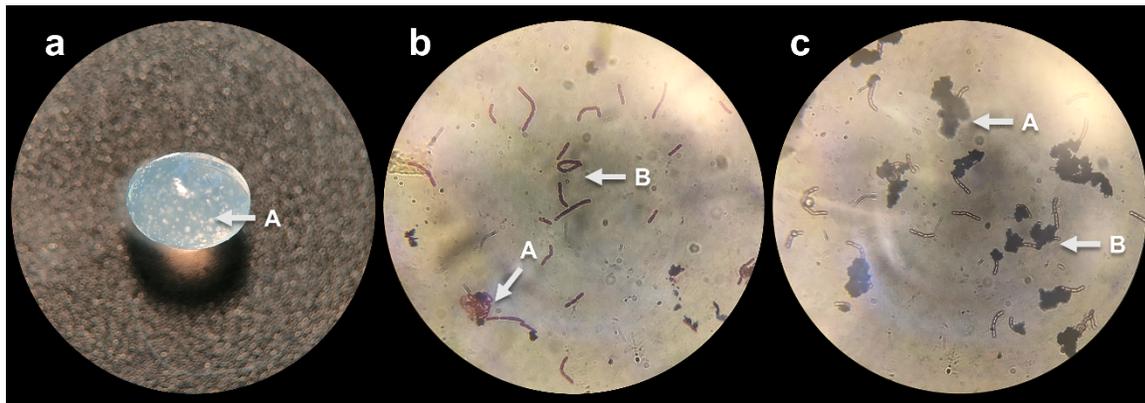


Figura 5. Fotografías del material encapsulado que se muestran: (a) Perla de alginato observada al microscopio estereoscópico, A: señalando colonias de bacteria. (b) y (c) Perla resuspendida de agua destilada con tinción Gram observada al microscopio óptico, en (b) A: señalando aglomerados de bacterias unidos a partícula de alginato, B: señalando bacterias libres; en (c) A y B: señalando a partículas de alginato con bacterias atrapadas.

Con respecto a la identificación de la presencia de la cepa bacteriana dentro de las perlas de alginato, como se puede observar en (a), en la Figura 5, se pueden identificar colonias dentro de las perlas de alginato, como se puede observar en (a), en la Figura 5, se pueden identificar colonias como puntos blancos en el cuerpo de la cápsula. Se infiere que la carga microbiana aumentó al poner en incubación las perlas en caldo papa dextrosa una vez formadas. Además, como se observa en (b) y (c) en la Figura 5 y comparando con la Figura 4, se corrobora la presencia de la especie bacteriana objetivo en las perlas formadas. También, se pueden identificar cúmulos de bacterias adheridas a partículas de alginato teñidas y bacterias libres.

Conclusiones

El uso excesivo e indiscriminado de agroquímicos ha causado serias problemáticas medioambientales y sociales. Bajo la premisa de la sostenibilidad, se propuso la alternativa de usar biofertilizantes, los cuales son más amigables con el medio ambiente y resultan menos costosos. La metodología propuesta para encapsular MPCV resultó ser bastante eficiente, obteniendo un EE (%) del 95.7 % corroborando además la presencia de la especie bacteriana de interés dentro del encapsulado. Las perspectivas futuras son buscar mejoras en el proceso, añadiendo y/o modificando variables para su posterior estandarización con el objetivo de emplear estas cápsulas en suelo agrícola para estudiar cómo de bien protegen las bacterias a los cultivos y promueven su crecimiento, así como determinar las condiciones óptimas de almacenamiento, vida útil de las cápsulas, y modelos de escalamiento industrial. Lo anterior para sentar las bases de una economía sólida para esta tecnología y propiciar su uso. También es importante mencionar que el encontrar y aislar cepas adicionales con estas características de interés que promuevan el crecimiento y desarrollo de plantas para convertirse en los compuestos activos de los encapsulados es una labor con potencial explotable.

Referencias

- Basu, A., Prasad, P., Das, S. N., Kalam, S., Sayyed, R. Z., Reddy, M. S., & El Enshasy, H. (2021). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects. *Sustainability*, 13(3), 1140.
- Benaissa, A. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria a review. *Algerian Journal of Environmental Science and Technology*, 873-880.
- Chávez-Díaz, I. F., Zelaya Molina, L. X., Cruz Cárdenas, C. I., Rojas Anaya, E., Ruíz Ramírez, S., & Santos Villalobos, S. D. (2020). Consideraciones sobre el uso de biofertilizantes como alternativa agrobiotecnológica sostenible para la seguridad alimentaria en México. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas*, 1423-1436.
- Défaz, A., & Moreira, J. (2017). Evaluación de alginato de sodio en la encapsulación de *Lactobacillus plantarum* en yogurt sin sabor [Tesis para optar un grado o título, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano]. Biblioteca Digital Zamorano. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/868f209e-2ea1-4f92-8bf5-4b65b6084b32/content>
- Galindo-Rocha, D., & Gómez-Luna, B. E. (2019). Efecto promotor de crecimiento en plantas de huizache (*Acacia farnesiana*) y lenteja (*Lens culinaris*) con uso de rizobacterias. *Verano de la ciencia de la Región Centro*, 5(4), 311-315.
- González-Cuello, R. E., Pérez Mendoza, J., & Morón Alcázar, L. B. (2015). Efecto de la Microencapsulación sobre la Viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* sometido a Jugos Gástricos Simulados. *Información tecnológica*, 26(5), 11-16.
- 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.
- Lee, H. R., Jung, S. M., Yoon, S., Yoon, W. H., Park, T. H., Kim, S., . . . Jung, S. (2019). Immobilization of planktonic algal spores by inkjet printing. *Scientific reports*, 9(1), 1-7.
- Martín-Aguilar, J. S., Gómez-Luna, B. E., & Veloz-García, R. A. (2018). EFECTO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO DEL DESARROLLO VEGETAL DE BACTERIAS DE SUELO DEL ÁREA NATURAL PROTEGIDA CERRO DEL CULIACÁN, GUANAJUATO. *Jóvenes en la Ciencia*, 4(1), 895-899.
- Meena, R. S., Kumar, S., Datta, R., Lal, R., Vijayakumar, V., Brtnicky, M., . . . T., D. (2020). Impact of agrochemicals on soil microbiota and management: A review. *Land*, 34.
- Meftah-Kadmiri, I., El-Mernissi, N., Azaroual, S. E., Mekhzoum, M. E., Qaiss, A. E., & Bouhfid, R. (2021). Bioformulation of microbial fertilizer based on clay and alginate encapsulation. *Current Microbiology*, 78(1), 86-94.
- Mosqueda-Arreguin, N. G., Gómez-Luna, B. E., & Díaz-Pérez, C. (2018). BACTERIAS DEL SUELO CON POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO EN PLANTAS. *Jóvenes en la Ciencia*, 4 (1), 1160 - 1163.
- Nosheen, S., Ajmal, I., & Song, Y. (2021). Microbes as Biofertilizers, a Potential Approach for Sustainable Crop Production. *Sustainability*, 13(4), 1868.
- Ortiz-Romero, N., Ochoa-Martínez, L. A., González-Herrera, S. M., Rutiaga-Quifones, O. M., & Gallegos-Infante, J. A. (2021). Avances en las investigaciones sobre la encapsulación mediante gelación iónica: una revisión sistemática. *Tecnológicas*, 24(52), 262-280.
- Pasin, B. L., Azón, C. G., & Garriga, A. M. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), 130-151.
- Saberi-Riseh, R., Ebrahimi-Zarandi, M., Gholizadeh-Vazvani, M., & Skorik, Y. A. (2021). Reducing drought stress in plants by encapsulating plant growth-promoting bacteria with polysaccharides. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12979.
- SMAOT. (2020). Mapa de las Áreas Naturales Protegidas de Guanajuato. Guanajuato, México. https://smaot.guanajuato.gob.mx/sitio/img/Mapa_anp_veda.jpg
- Smrdel, P., Bogataj, M., & Mrhar, A. (2008). The influence of selected parameters on the size and shape of alginate beads prepared by ionotropic gelation. *Scientia Pharmaceutica*, 76(1), 77-90.

Young, C. C., Rekha, P. D., Lai, W. A., & Arun, A. B. (2006). Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid. *Biotechnology and bioengineering*, 95(1), 76-83.