

Liberación de comunidades microbianas encapsuladas, a diferentes pH y temperaturas, en un sistema de suelo de café

Release of encapsulated microbial communities at different pH and temperatures in a system of soil of coffee

Roberto Carlos Cosme De la Cruz¹; Ruth Noemí López Montañez¹; Reyna Esther Rea Zenozain¹; Luis Antonio Llanco Albornoz²; Melissa Rabanal Atalaya^{3*}

¹ Instituto Nacional de Innovación Agraria, Av. La Molina 1981, Lima, Perú.

² Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, San Martín de Porres, Lima, Perú.

³ Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Carlos Germán Amezaga 375, Cercado de Lima, Lima, Perú.

* Autor correspondiente: mrabanala@unmsm.edu.pe (M. Rabanal).

ORCID de los autores:

R. C. Cosme De la Cruz: <https://orcid.org/0000-0002-5774-9325>

R. E. Rea Zenonain: <https://orcid.org/0000-0002-6596-3700>

M. Rabanal Atalaya: <https://orcid.org/0000-0001-9950-8872>

R. N. López Montañez: <https://orcid.org/0000-0002-9976-6019>

L. A. Llanco Albornoz: <https://orcid.org/0000-0003-2175-9406>

RESUMEN

El encapsulamiento de organismos en polímeros es importante para poder conservar y liberar células viables, protegiéndolos del estrés medioambiental con la finalidad de asegurar la nutrición en las plantas y la salud del suelo y, por ende, se pueda incrementar el rendimiento en los cultivos del café. En el presente estudio, se prepararon diferentes concentraciones de alginato de sodio y quitosano para encapsular un consorcio de microorganismos hasta llegar a la formulación óptima, cuya caracterización se realizó por Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier y Microscopía electrónica de barrido. Se evaluó la capacidad de absorción y liberación de microorganismos en líquido acuoso, en suelo salino, y en un cultivo del café y se realizó ensayos de sobrevivencia del microbioma encapsulado durante un mes. Los resultados muestran que la mezcla de los biopolímeros utilizado es estable a los diferentes valores de pH y temperatura, destacando a un pH 5 a 30 °C, cuya liberación prolongada del microbioma fue del 26% ($6,5 \times 10^6$ UFC mL⁻¹) en un suelo agrícola. El estudio cinético del microbioma encapsulado en el suelo agrícola del café evidencia claramente una liberación gradual del microbioma hasta las 72 horas y la sobrevivencia del microbioma encapsulado luego de un mes a temperatura ambiente se redujo en 8%.

Palabras clave: Alginato de sodio; quitosano; encapsulamiento; microbioma; café.

ABSTRACT

The encapsulation of organisms in polymers is important in order to preserve and release cells viable, protecting them from stress environmental in order to ensure the nutrition of the plant and the health of the soil health and thus increase the yields in the crops of the coffee. In the present study, different concentrations of alginate of sodium and chitosan were prepared to encapsulate a consortium of microorganisms until reaching the optimal formulation, whose characterization was carried out by Fourier Transform Infrared and Scanning Electron Microscopy. The capacity of absorption and release of microorganisms in liquid aqueous, in soil saline, and in a soil of coffee was evaluated and the survival of the microbiome encapsulated during one month. The results show that the blend of biopolymers used is stable at different values of pH and temperatures, highlighting at pH 5 at 30 °C, whose release prolonged of the microbiome was 26% (6.5×10^6 CFU mL⁻¹) in an agricultural soil. The study of kinetic of the microbiome encapsulated in soil of coffee clearly evidences a gradual release of the microbiome up to 72 hours and its survival of the microbiome encapsulated after keeping one month at room temperature was reduced in 8%.

Keywords: Alginate of sodium; chitosan; encapsulation; microbiome; coffee.

Recibido: 14-07-2025.

Aceptado: 4-12-2025.



Esta obra está publicada bajo la licencia [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

INTRODUCCIÓN

Es importante comprender los mecanismos del proceso de interacción entre las plantas y los microorganismos, los cuales contribuyen significativamente en la productividad de los cultivos agronómicos; sin embargo, las comunidades microbianas colocadas en las plantas son inestables y cambian dependiendo de factores como el pH, la temperatura, la salinidad, y la concentración de sustancias tóxicas y de las condiciones medio-ambientes, los cuales pueden afectar significativamente la supervivencia y la eficacia de estos microorganismos introducidos (Chamard et al., 2024; Netherway et al., 2024; Philippot et al., 2024). Para solucionar estos inconvenientes, se ha probado como proceso la encapsulación de los microorganismos, el cuál es un método de empaquetamiento de sustancias químicas y biológicas formada por partículas con una membrana polimérica (Riseh et al., 2021; Zveushe et al., 2025). La microencapsulación es una tecnología para encapsular sustancias capaces de liberarlas a velocidades controladas bajo ciertas condiciones y para proteger a los microorganismos en el suelo (Cáceres et al., 2025; Zveushe et al., 2025).

Entre los biopolímeros naturales más utilizados para la microencapsulación se encuentran los polisacáridos como la quitina, el alginato de sodio, el almidón y la celulosa, que se caracterizan por presentar propiedades únicas y son respetuosos con el medio ambiente (Da Silva Simões et al., 2025; Duraimurugan et al., 2024; Matei et al., 2022). Químicamente, estos polímeros consisten en unidades de monosacáridos unidas por enlaces glucosídicos, pero sus diversos grupos funcionales y cargas confieren de su versatilidad. Su utilización para la agricultura ofrece ventajas notables, incluyendo mayor biodegradabilidad, no toxicidad y amplia disponibilidad (Cáceres et al., 2025; Lewicka et al., 2024).

Uno de ellos es el alginato, biopolímero soluble en agua, sin ramificaciones, cuya cadena principal consta de dos unidades monoméricas, el ácido β -D-mannurónico (M) and el ácido α -L-gulurónico (G) distribuidos aleatoriamente en la cadena y con enlaces glucosídicos 1 \rightarrow 4. Son posibles tres formas distintas de la estructura molecular: MM, GG y MG (Ahmad et al., 2024). Los bloques G pueden formar reticulación con la presencia de cationes divalentes que conducen a la formación de gel de alginato (Cáceres et al., 2025; Thị-Thanh-Trúc et al., 2025; El Hariri et al., 2022). Esta característica de gelificación hace que el alginato sea ampliamente

aplicable en la encapsulación de alimentos o productos farmacéuticos, cuyas propiedades de las perlas están influenciadas por el peso molecular y por la proporción de las unidades monoméricas del biopolímero (Ureña et al., 2024).

El alginato, a veces se mezcla con el quitosano para formar un gel ionotrópico, de forma esferoide y de tamaño en el orden de μ m a mm. El quitosano es un polisacárido catiónico producido por la desacetilación de la quitina, formado por unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4). El quitosano y el alginato son polielectrolitos, que tras juntarse forman un complejo polielectrolítico. Cuando el quitosano se mezcla físicamente con alginato reticulado por iones de calcio, forman un hidrogel de red interpenetrante con la capacidad de hincharse, favoreciendo así la liberación del químico (Sharif et al., 2025).

El uso de formulaciones de quitosano en la agricultura es diverso y abarca la protección de las plantas contra microorganismos, la estimulación del crecimiento vegetal, la liberación controlada de agroquímicos, el control de plagas y las aplicaciones poscosecha. Debido a su papel multifuncional en las plantas, el quitosano se reconoce cada vez más como un componente valioso de las matrices poliméricas para la agricultura sostenible.

Los polisacáridos, quitosano y alginato, han sido utilizado ampliamente como posibles materiales portadores en la encapsulación microbiana debido a numerosas ventajas tales como ser no tóxicos, biocompatibles, biodegradables, abundantes y sostenibles, además presentan una estructura capsular más estable y con más capacidad de carga comparado a los mismos polisacáridos utilizados individualmente (Duraimurugan et al., 2024; Beula, 2024).

El objetivo del presente de investigación fue desarrollar una matriz biodegradable basado en alginato de sodio y quitosano para la microencapsulación de un consorcio microbiano con la finalidad de mejorar la producción del café del Perú. Por lo que se han realizado estudios sobre la cinética de liberación del consorcio microbiano en la microencapsulación, así como se ha realizado un estudio en la optimización de la liberación controlada de los microbiomas bajo diferentes condiciones de suelo del café tales como el pH y temperatura, y finalmente se ha evaluado la estabilidad de las perlas durante un mes a temperatura ambiente y bajo sombra.

METODOLOGÍA

El desarrollo del material encapsula fue llevado a cabo en el Laboratorio de Investigación y desarrollo de Química orgánica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y los ensayos de cuantificación y liberación de microorganismos en diferentes condiciones del suelo del café, el cual presentaba un pH 9 y textura franga, fueron llevados a cabo en el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), distrito de La Molina,

departamento de Lima, Perú. Localizado a 12° 4' 36,03" S y 76° 56' 42,857" O con una altitud de 112 m.s.n.m.

Se utilizaron los siguientes equipos: Espectrofotómetro infrarrojo con Transformada de Fourier (Thermo scientific, modelo Nicolet IS10), UV-VIS (Thermo scientific, modelo Helios 9423 UVG 1000A), Microscopía electrónica de barrido (INSPECT, modelo S50), estufas (Thelco Precision

Scientific, modelo 26), ultracentrífuga (Labwe, modelo BT20R), agitadores (IKA, modelo RCT basic) y pH metro (Oakion, modelo PH/CON 510).

Caracterización de las matrices poliméricas

Las matrices poliméricas se trabajaron con los polisacáridos alginato de sodio y quitosano, cuya caracterización química se realizó a través de su peso molecular por viscosimetría, la cual se basa en la obtención de la viscosidad intrínseca, que está relacionada con la masa molecular. Se analizaron por Espectroscopía infrarrojo con Transformada de Fourier, de este último se determinó la proporción de los ácidos manurónicos y ácidos gulurónicos del alginato de sodio, mientras que al quitosano se determinó el grado de desacetilación por los métodos FT-IR, UV-visible primera derivada y por titulación conductimétrica.

Preparación de matrices poliméricas para la microencapsulación

Las dos primeras matrices se prepararon de la siguiente manera: 20 mg/ml del alginato de sodio se agregó una solución de quitosano al 1% de 200 mPa.s por goteo (Q200) y a la segunda una solución de quitosano al 1% de 400 mPa.s (Q400). Luego, ambas soluciones independientemente se agregaron a una solución de CaCl_2 al 0,5%. Las perlas fueron secadas presentando un diámetro de 2 mm.

Para la tercera y cuarta forma se preparó usando una solución de 0,25 g de alginato de sodio de 800 mPa.s en 10 ml de CH_3COOH al 1%, luego se agregó a 15 ml de caldo de cerebro corazón (37 g/l) y 1 ml de quitosano de 400 mPa.s. Esta mezcla se trabajó de dos maneras: la primera parte fraccionada se añadió por goteo a una solución de CaCl_2 a 0,2 M y se dejó en agitación durante 30 minutos. Se lavó con agua destilada, se secó en la estufa a 40 °C y se midió su diámetro con un vernier presentando 5 mm (M1). La segunda parte fraccionada, se dejó reposar para eliminar las burbujas y seguidamente se agregó a una solución CaCl_2 a 0,2 M y se dejó en agitación durante 30 minutos. Se lavó con agua destilada, y se dejó en 1 ml de caldo de cerebro corazón durante 15 horas. Se volvió a lavar con agua destilada, se secó en la estufa a 40 °C durante 15 minutos y se midió su tamaño de 5 mm de diámetro (M2).

Formulación óptima de la matriz polimérica para la encapsulación del microbioma

La matriz polimérica óptima se preparó disolviendo 0,2 g de alginato de sodio de 200 mPa.s en 10 ml de ácido acético al 1% y se agregó 0,1 g de alginato de 800 mPa.s, se añadió gota a gota 1 ml de 0,005 g/ml de quitosano y se goteó en 50 ml de CaCl_2 al 0,2% durante 40 min, se lavaron dos veces con agua destilada y se liofilizaron.

Reproducción y encapsulación de microorganismos

Una cepa bacteriana aislada de la rizosfera de la planta del café se cultivó en caldo de tioglicolato, infusión de cerebro de corazón y R2H, cuyo consorcio microbiano se traspasó en medios de

cultivo de agar nutritivo y agar Hugh Leifson. Para lo cual, se realizó previamente diluciones seriadas hasta 10^{-5} en solución salina al 0,85% a partir de los caldos inoculados. Todas las diluciones fueron sembradas en los agares antes mencionados mediante la técnica de difusión. Los medios fueron incubados a 28 °C por toda la noche. Posteriormente, se realizó la purificación de las cepas bacterianas.

Después de establecer la curva de crecimiento de la cepa, el inóculo a encapsular se propagó mezclando 1 ml de microorganismos cultivados en 250 ml de caldo de infusión de cerebro de corazón y se inoculó a la temperatura de 28 °C en la noche, se centrifugó a 4500 rpm durante 15 min y el pellet bacteriano obtenido se lavó con 20 ml de solución salina al 0,85% y se resuspendió en 50 ml de solución salina estéril tampón de 0,02 M a un pH 7,3 hasta obtener un D.O. 1,2 (600 nm).

La encapsulación de los microorganismos se realizó sumergiendo las perlas en 10 ml del inóculo bacteriano suspendido en solución buffer salino 0,02 M durante 2 horas, se lavaron dos veces con agua destilada estéril para retirar restos de células microbianas y en 10 mL de solución salina tamponada (Trabelsi et al., 2013).

Estudio cinético de la liberación microbiana

Para evaluar la cinética de liberación de los microorganismos encapsulados a nivel *in vitro*, se tomó una muestra por hora durante 6 horas y se midió la lectura en el espectrofotómetro a 600 nm. La data fue correlacionada con el valor de Unidades Formadoras de Colonia (UFC mL^{-1}) usando la fórmula obtenida de la curva de crecimiento.

Liberación de la población microbiana encapsulada mantenida a diferentes valores de pH y temperaturas *in vitro*

Para evaluar la liberación de los microorganismos encapsulados (D.O. 1,8) en diferentes valores de pH y temperaturas, se pesó 0,05 g de perlas y se colocaron en 5 ml de solución ácido acético al 1% a los pHs de 4, 5, 6 y 7 y cada uno a las temperaturas de 20, 25 y 30 °C. Se realizó la toma de muestra al cuarto día y se midió la lectura en el espectrofotómetro a 600 nm y se realizó el recuento de células en las placas. El sistema se realizó utilizando agua destilada y agua conteniendo sales presentes en un suelo agrícola del café.

Liberación del microbioma encapsulado en un sistema de suelo del café

Se colocó 1 g de perla con el microbioma encapsulado (D.O. 1,8 Abs.) en 100 g de suelo agrícola del café. El sistema se colocó en un recipiente de 300 cm^3 de capacidad durante 3 días a temperatura ambiente realizándose riegos consecutivos con 20 ml de agua destilada una vez al día. Se tomó una muestra de suelo cada 24 horas disolviéndose en 50 ml de una solución tampón fosfato salino con agitación constante a 150 rpm durante 30 minutos. Se calculó las UFC mL^{-1} mediante la técnica de recuento celular en placa.

Sobrevivencia del microbioma encapsulado

Las perlas con el microbioma encapsulado se mantuvieron durante un mes (D.O. 1,8) a temperatura ambiente y bajo sombra. Se pesaron 0,05 g de perlas y se disolvieron en 10 mL de la solución Tripolifosfato de sodio en agitación constante durante toda la noche y se calculó las UFC mL⁻¹ mediante la técnica de recuento celular en placa.

Espectroscopía Infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros de los polisacáridos de quitosano y alginato de sodio, así como las microperlas Q200 y las perlas de la matriz óptima con y sin el

microbioma se realizaron a una velocidad de barrido de 120 barridos por minuto en el rango de longitud de onda de 4000-500 cm⁻¹ con una resolución de 4 cm⁻¹ en forma de pastillas de KBr.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se evaluó la superficie y la morfología de los polisacáridos alginato de sodio y quitosano, así como también la matriz polimérica Q200 y la matriz óptima con el microbioma y luego de la liberación de los microorganismos en la tierra, siendo estos dos últimos secados en una estufa a 37 °C durante 24 horas previo al análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las comunidades microbianas en los suelos conducen entre 80 y 90% de los procesos biológicos desarrollados en el suelo, debido a sus múltiples nichos ecológicos, entre los que destacan la mitigación de alteraciones exógenas, promoción de crecimiento vegetal, actividad de biocontrol, ciclaje de nutrientes, producción de biomasa vegetal, estructura y fertilidad del suelo, la degradación de compuestos tóxicos, entre otros; sin embargo su rol se ve fuertemente afectado por las condiciones climáticas, modificaciones del suelo a nivel físico, químico y biológico, por ejemplo temperatura, humedad, salinidad, aireación, estados de oxido-reducción, pH, entre otros. De esta manera, el desequilibrio en las comunidades microbianas del suelo desencadena procesos de degradación biológica y esto lleva a una reducción del rendimiento y calidad de los cultivos (Cruz-Cárdenas et al., 2021).

Por esta razón, la preparación de inóculos microbianos encapsulados por polímeros como el alginato y/o el quitosano se presentan como una alternativa ecológica, dichos polímeros fueron utilizados en el presente trabajo de investigación con la finalidad de incrementar el rendimiento en la producción de la agricultura del café.

Las matrices de polisacáridos, alginato de sodio y quitosano fueron caracterizadas por FT-IR tal como se muestra en la Figura 1 y 2. El quitosano tiene un pico ancho e intenso de absorción atribuido al grupo O-H y a las vibraciones de estiramiento del enlace N-H en 3444 cm⁻¹, a 2935 cm⁻¹ se detecta el estiramiento del grupo C-H y una banda a 1636 cm⁻¹ que corresponde al grupo C=O de la amida secundaria. La señal 1420 cm⁻¹ es asociada con las vibraciones de enlace CH₂-CH y CH-OH, a 1086 cm⁻¹ y 1042 cm⁻¹, presenta vibraciones de C-O y C-N, respectivamente (Bentancur et al., 2025; Tavares et al., 2020; Klein et al., 2016) y a 902 cm⁻¹ muestra la tensión C-H de grupos anoméricos (Rodríguez et al., 2010).

El FT-IR del alginato de sodio muestran muchas bandas observadas entre 800 cm⁻¹ a 1800 cm⁻¹, las cuales están directamente relacionadas con el contenido del residuo del ácido manurónico y del ácido gulurónico del alginato de sodio. En la región de la huella digital, los residuos de ácidos manurónico se encuentran en bandas cercanas a

822 cm⁻¹ y 893 cm⁻¹ (Chandia et al., 2001), y a 808 cm⁻¹ (Mollah et al., 2023), mientras que los residuos de ácido gulurónico absorben en las bandas de 780 cm⁻¹, 813 cm⁻¹, 903 cm⁻¹, 947 cm⁻¹ y sus uniones α(1→4) corresponde a 946 cm⁻¹ (Mollah et al., 2023).

El alginato de sodio presenta una banda amplia debido a los enlaces de los grupos O-H y N-H en 3424 cm⁻¹, dos bandas típicas del alginato a 1612 cm⁻¹ y 1416 cm⁻¹ características del estiramiento asimétrico y simétrico de los grupos COO⁻ (Gómez et al., 2018), tres señales a 1125 cm⁻¹, 1036 cm⁻¹ y 894 cm⁻¹ correspondientes al enlace C-O-C (Gómez et al., 2018) y la señal en 1036 cm⁻¹ provenientes de un estiramiento O-H. Mollah et al. (2023) reporta que la señal 1080 cm⁻¹ que en nuestro caso se encuentra desplazada a 1095 cm⁻¹ está relacionada con los cambios en la vibración en las proporciones M/G, además esta absorbancia se debe a las vibraciones de estiramiento del anillo de 6 miembros C-O-C de ambos residuos del ácido manurónico y del ácido gulurónico. Finalmente, dicha figura muestra picos de absorción presentes en 1416 cm⁻¹ y 1612 cm⁻¹, las cuales son usadas para estimar la proporción de los residuos M y G, respectivamente.

También se ha caracterizado las perlas con el método Q200 (Figura 3), el cual presenta una banda muy ancha en 3442 cm⁻¹ debido a los puentes de hidrógeno asociado a los grupos O-H y N-H entre el alginato y el quitosano. Se evidencia un pico pequeño en 1320 cm⁻¹ evidenciando el grupo -NH₂ de la amida III, así como sus vibraciones de su estructura piranósica en 1084 cm⁻¹ y 1033 cm⁻¹. El alginato de sodio muestra los picos característicos en 1634 cm⁻¹ y 1428 cm⁻¹ para los residuos G y M, respectivamente, así como su unión α(1→4) en 953 cm⁻¹.

Adicionalmente, se realizaron análisis para determinar el peso molecular y la viscosidad intrínseca del alginato de sodio, el cual fue de 630 KDa y 846 mPa.s, respectivamente y de su espectro IR, se obtuvo una relación M/G de 0,73; mientras, que el quitosano presentó un peso molecular de 781 KDa con un grado de desacetilación de 83% en promedio por los métodos de FT-IR, UV-visible primera derivada y por titulación conductimétrica.

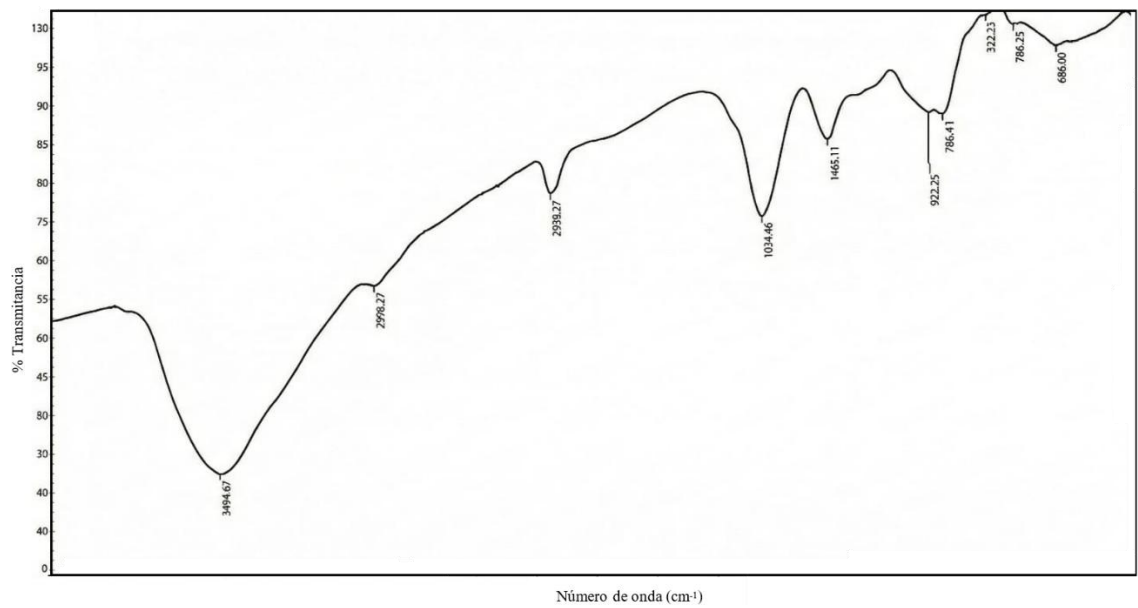


Figura 1. Espectro FT-IR del quitosano de 200 mPa.s

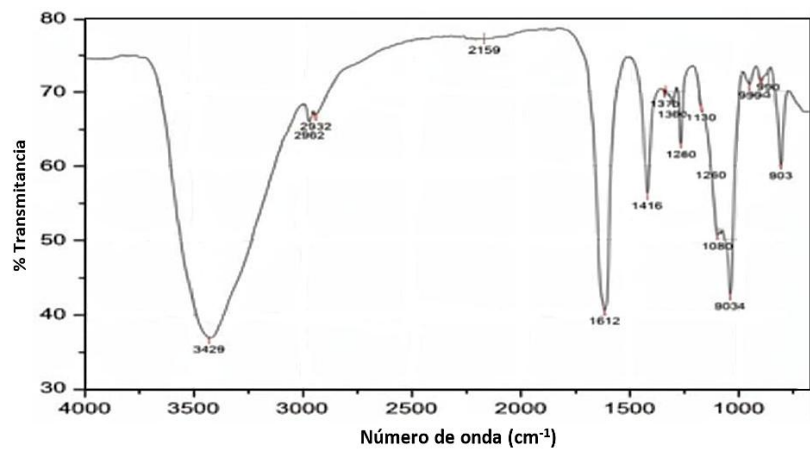


Figura 2. Espectro FT-IR del alginato de sodio.

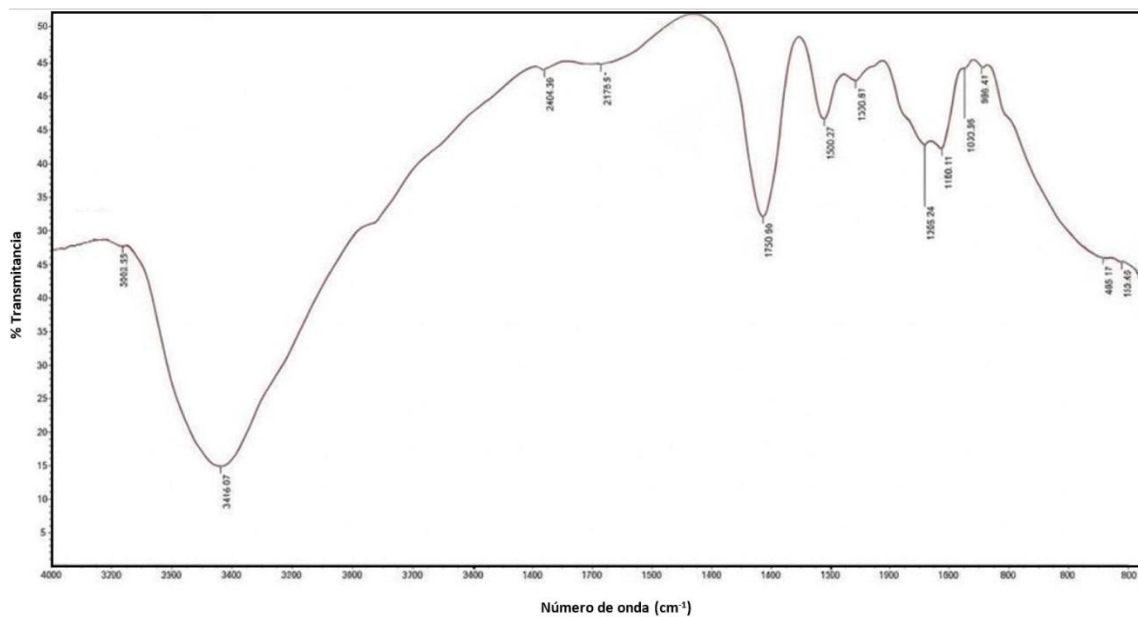


Figura 3. Espectro FT-IR de las perlas obtenidas con el método Q200.

Por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Los análisis por SEM son utilizados para darnos idea de la homogeneidad y de la microestructura de la muestra. Se analizaron las perlas obtenidas por los métodos Q200 y M1 con y sin liofilización mostrados en las Figuras 4 y 5. Esto se realizó con la finalidad de evaluar la generación de los poros tras la liofilización, lo cual favorece el ingreso del material biológico cuando las perlas son sumergidas en los microbomas. Las perlas húmedas obtenidas por el método Q200 muestran una superficie rugosa, mientras que las mismas perlas liofilizadas se acentuaron los poros y especialmente en las perlas obtenidas por el método M1, que también se puede apreciar paredes constituidas por placas, lo cual indicaría la presencia de un entrecruzamiento polimérico.

Los estudios de cinética de la liberación microbiana de los cuatro tipos de perlas con $1,16 \times 10^{10}$ UFC mL^{-1} son mostrados en la Figura 6. Las perlas fueron preparadas variando concentraciones de alginato de sodio y quitosano, ya que hay una gran cantidad de reportes previos que los escogen (Da Silva Simões et al., 2025; Cong et al., 2022; Nair et al., 2020).

La cinética, después de cuatro horas de evaluación, muestra que la perla preparada con el método M2, preparado con un alginato de sodio de alto peso molecular de 800 mPa.s libero gran cantidad de población microbiana de manera intensa correspondiente con un D.O. 0,296 y, por ende, mostrando poca interacción con el microbioma.

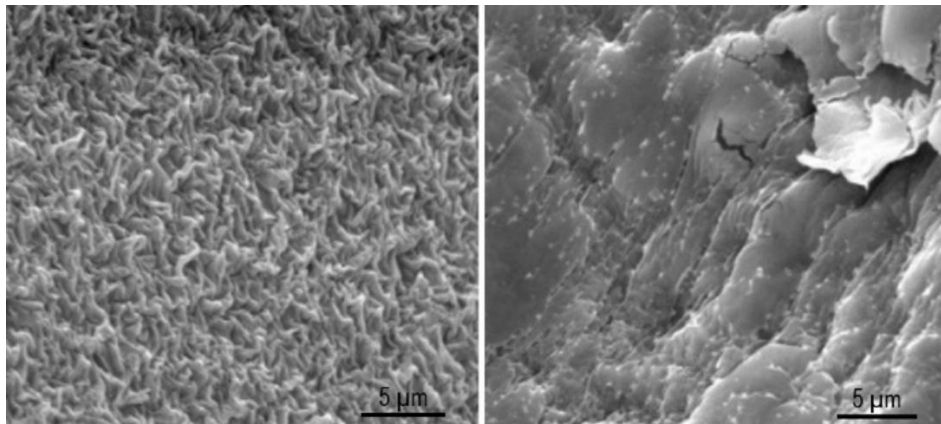


Figura 4. Imagen SEM de la perla obtenida por el método Q200 sin liofilizar (izquierda) y liofilizado (derecha).

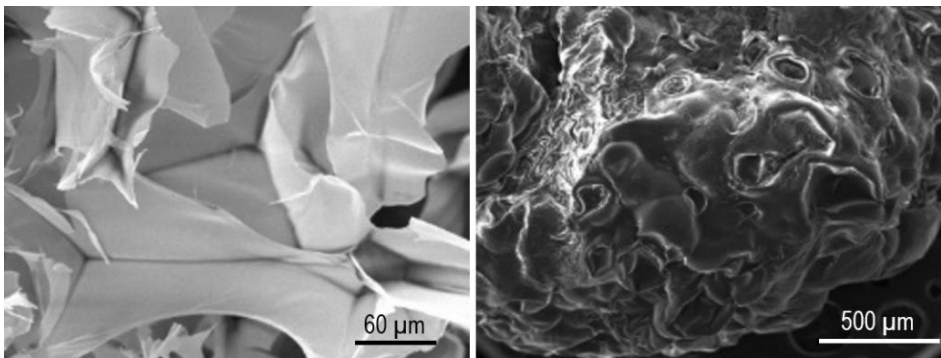


Figura 5. Imagen SEM de la perla obtenida por el método M1, sin liofilizar (izquierda) y liofilizado (derecha).

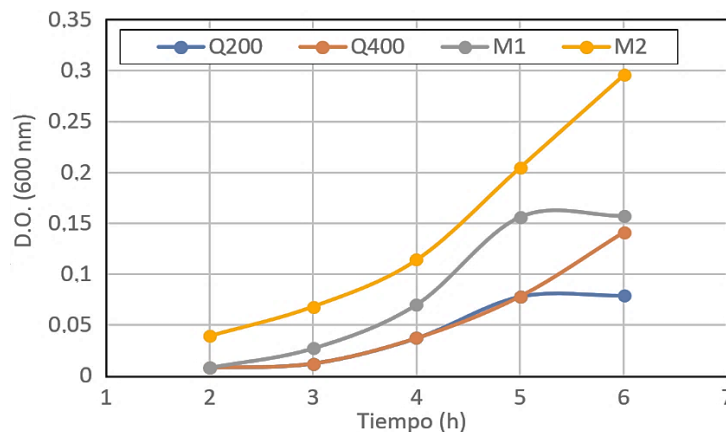


Figura 6. Cinética de la liberación de la población microbiana en los cuatro tipos de perlas.

Por otro lado, las perlas obtenidas con el método Q200 utilizaron en su preparación, un alginato de sodio de bajo peso molecular de 200 mPa.s, cuya cinética evidencia una fuerte interacción con el microbioma obteniéndose un D.O. 0,079, casi no permitiendo su liberación, razón por la cual se preparó una formulación final con una mezcla de ambos pesos moleculares del alginato de sodio, utilizando la de 800 mPa.s en mayor proporción que la 200 mPa.s, con la finalidad de obtener un peso molecular intermedio entre ambos y de esta manera, poder controlar la liberación del microbioma. La Figura 7 muestra la imagen SEM de las perlas obtenidas por el método Q200 con microbioma, la cual muestra una superficie arrugada y lisa sin ninguna porosidad y el SEM de las perlas obtenidas sin el microbioma, muestra presencia de escamas de alginato de calcio.

Ensayos de liberación de la población microbiana encapsulados a diferentes valores de pH y temperaturas a nivel *in vitro*

Como se explicó anteriormente, el uso del alginato de alto peso molecular les confiere a las perlas una buena estabilidad, pero las interacciones con el microbioma son bastante fuertes y no permite la liberación del mismo. Es por ello, en la formulación óptima tuvimos que hacer una mezcla de alginato de alto peso molecular con una pequeña proporción de alginato de bajo peso molecular. La Figura 8 muestra el Espectro FT-IR de las perlas obtenidos en la formulación óptima y con el microbioma. El espectro con el microbioma muestra desplazamientos a números de onda un poco más bajos debido a las interacciones de los polisacáridos con el microbioma, el cual le resta densidad electrónica.

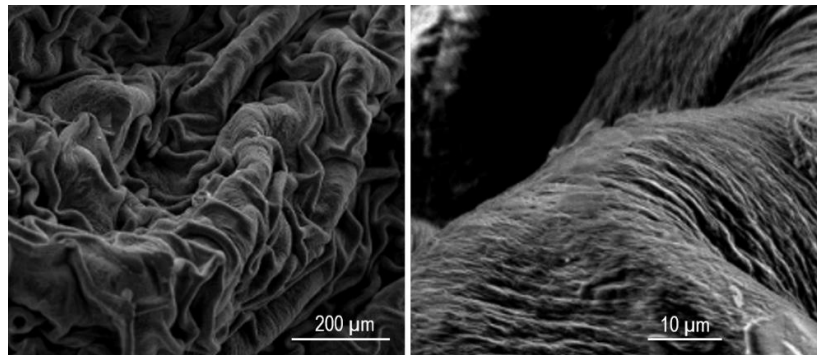


Figura 7. Imagen SEM Q200 incorporadas con microorganismo (izquierda) y liberación de microorganismos en la tierra (derecha).

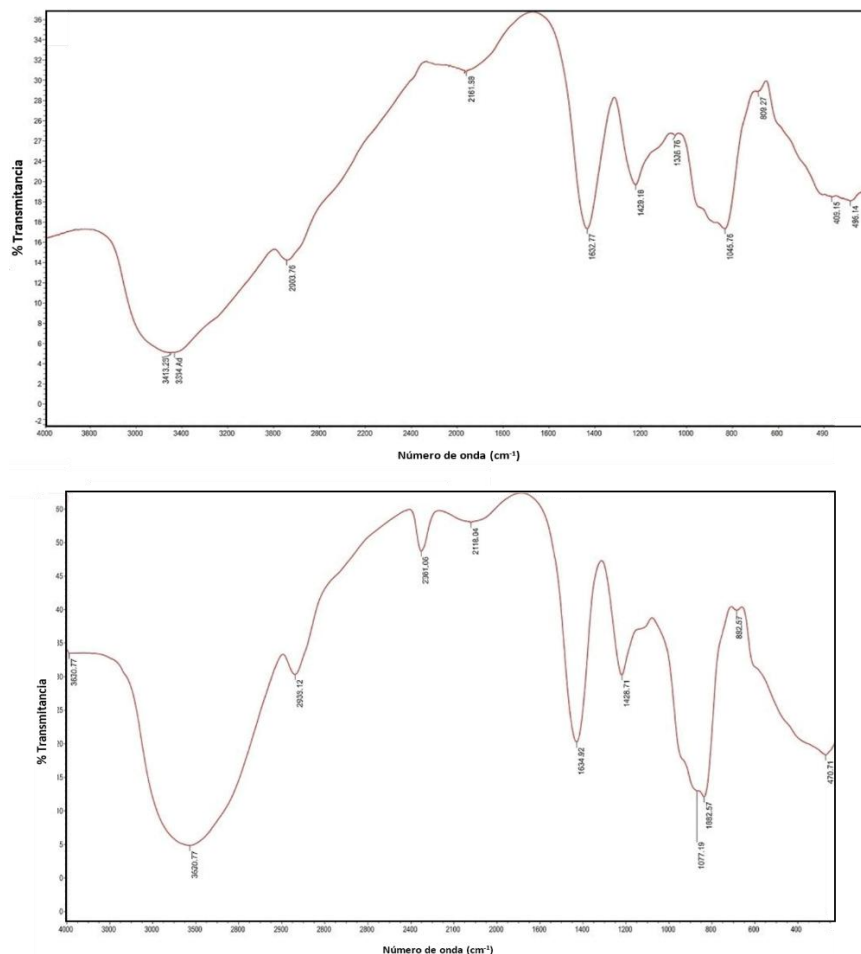


Figura 8. Espectro FT-IR de las perlas obtenidos en la formulación óptima (superior) y con el microbioma (inferior).

Tabla 1

Valores de liberación del microbioma encapsulado en un sistema de agua al cuarto día

pH	Valores de densidad óptica (D.O.)			Valores de UFC ml ⁻¹		
	20 °C	25 °C	30 °C	20 °C	25 °C	30 °C
4	0,151	0,405	0,22	1,44x10 ⁶	6,60x10 ⁶	2,72x10 ⁶
5	0,201	0,465	0,341	1,43x10 ⁶	1,50x10 ⁷	2,34x10 ⁶
6	0,189	0,293	0,347	1,05x10 ⁶	9,09x10 ⁵	2,26x10 ⁶
7	0,179	0,394	0,365	1,65x10 ⁶	2,65x10 ⁶	3,36x10 ⁶

La banda a 3426 cm⁻¹ corresponde a las interacciones O-H y N-H, cuya banda se muestra mucho más ancha, debido a la interacción de los polisacáridos alginato de sodio y quitosano con el microbioma, que el obtenido sin el microbioma. De la misma manera ocurre con la banda 1036 cm⁻¹, señal que corresponde a los grupos O-H. También se pueden apreciar los dos picos características del alginato en 1629 cm⁻¹ (G) y 1419 cm⁻¹ (M), obteniendo una proporción M/G de 0,95.

Se estudio también la liberación microbiana encapsuladas realizada con el método óptimo, primero usando un sistema con agua destilada a diferentes valores de pHs de 4, 5, 6 y 7 y a las temperaturas de 20, 25 y 30 °C, tal como se muestra en la Tabla 1. Los resultados muestran que en todos los valores de pH y temperatura hubo liberación de la población microbiana encapsulada, siendo los valores más altos de liberación de células microbianas a las temperaturas de 25 °C a pH 4 con una D.O. de 0,405 y 6,60 x 10⁶ UFC mL⁻¹ y a pH 5, siendo su D.O. de 0,465 y 1,50 x 10⁷ UFC mL⁻¹, teniendo este último al 30% de la población microbiana liberada.

Las perlas óptimas también se probaron con un sistema utilizando agua salina presentes en un suelo agrícola a los valores de pH de 4 a 7 y a las temperaturas de 20, 25 y 30 °C, con la finalidad de simular un suelo agrícola del café mostrados en la Tabla 2. Los resultados muestran que en todos los casos hubo una liberación de la población microbiana menor comparada al sistema anterior, resaltando las temperaturas de 25 y 30 °C.

A 25 °C, los valores de D.O. y UFC mL⁻¹ son a pH 4 de (0,152 y 1,6 x 10⁶), a pH 5 de (0,167 y 2,1 x 10⁶) y a pH 6 de (0,200 y 4,0 x 10⁶), respectivamente; mientras que, a 30 °C, el valor más alto D.O. se obtuvo a un pH 5 con un valor de 0,268 y las UFC mL⁻¹ de 6,5 x 10⁶. El valor más alto de liberación de la población microbiana bajo el sistema de agua salina fue a un pH 5 a 30 °C, cuyos valores corresponden a un 26% de la población microbiana previamente encapsulada.

Dichos resultados difieren de los presentados por Zhao & Wang (2025), quienes muestran que tras evaluar suelos a diferentes condiciones tales como el pH desde 5 a 8 y a las temperaturas desde 20 a 40 °C, los microbios encapsulados alcanzaron una degradación máxima con el 83,46% de atrazina a un pH 8, mientras que la mayor degradación de nicosulfurón a un pH 7 fue del 65,28%; sin embargo, la temperatura óptima es similar a nuestros resultados, alcanzando sus máximos valores de degradación a los 35 °C. Cabe señalar, que es importante conocer la temperatura óptima, ya que podría favorecer la reproducción y el crecimiento microbianos, mejorando así el proceso

de degradación. Zveushe et al. (2025), realizaron un estudio sobre suelos contaminados con Cr(VI) mediante microbios, hongos y bacterias usando capsulas de alginato de sodio a pHs entre 5 a 7. Luego de 70 días de evaluar la reducción del cromo y la estabilización del proceso, los resultados muestran que los microbios tuvieron buenos resultados comparados con los tratados con hongos y bacterias, reduciendo significativamente el pH, la conductividad eléctrica y el potencial redox del suelo, al tiempo que aumentaron la actividad de las enzimas del suelo; sin embargo, advierten que la eficacia microbiana puede verse inhibida por las altas concentraciones de contaminantes.

Ensayo de liberación del microbioma encapsulado bajo el sistema de suelo agrícola

Los resultados del ensayo de la cinética de liberación del microbioma encapsulado bajo el sistema de suelo agrícola a pH 9 y a temperatura ambiental se muestran en la Figura 9, el cual muestra que una liberación de células de manera continua, obteniendo valores de UFC mL⁻¹ de 5,38 x 10⁵ a las 24 horas, 2,3 x 10⁸ a las 48 horas y 7,24 x 10¹⁰ a las 72 horas, correspondiendo este último al 32% de la población microbiana previamente encapsulada.

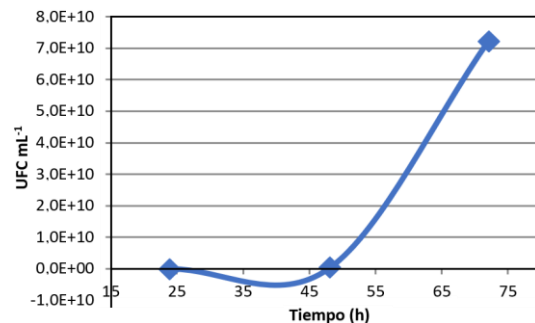


Figura 9. Cinética de liberación de la población microbiana en el sistema de suelo agrícola.

La cinética de liberación de microbios encapsulados usando las cepas *Stenotrophomonas* sp. MY01, *Rhizobium* sp. GL01 y *Bacillus* sp. YB01 mostraron que al séptimo día obtuvieron las tasas más altas de degradación del 82,62% para la atrazina y del 65,28% para el nicosulfurón (Zhao & Wang, 2025); mientras que Chávez-Falcón et al. (2022) reportan que tras encapsular microbios mediante gelificación iónica utilizando agavinas, proteína de suero y alginato mostraron que la liberación de microbios en todos los casos se da en un tiempo máximo de 250 min y que los ensayos con mezclas de ellos mostraron un incremento en la supervivencia del microbio en comparación con las encapsuladas por separado. Cabe señalar que

las diferencias encontradas en los diferentes autores sobre el tiempo óptimo de liberación son debido al tipo de cepa microbiana, a su concentración y al peso molecular y concentración de las unidades monoméricas del material encapsulante.

Ensayo de sobrevivencia del microbioma encapsulado

El ensayo de sobrevivencia del microbioma encapsulado mostró solo una reducción del 8% (UFC mL⁻¹ de 2,0 x 10¹⁰) de la población microbiana previamente encapsulada (UFC mL⁻¹ de 2,64 x 10¹¹)

en perlas mantenidas durante un mes a temperatura ambiente y bajo sombra. Estos resultados concuerdan con Da Silva Simões (2025), quienes reportaron un sistema de micro-encapsulación basado en alginato y quitosano durante 28 días de almacenamiento refrigerado a 4 ± 1 °C, en el cual la supervivencia de probióticos encapsulados se redujo en un 1,397 log UFC mL⁻¹. Ellos encontraron que el recubrimiento de quitosano en la micropartícula de alginato-quitosano proporcionó una mayor protección a los probióticos durante 28 días de almacenamiento, favoreciendo una viabilidad prolongada.

Tabla 2
Valores de liberación del microbioma encapsulado en un sistema de agua salina presentes en un suelo agrícola del café

pH	Valores de densidad óptica			Valor de UFC mL ⁻¹		
	20 °C	25 °C	30 °C	20 °C	25 °C	30 °C
4	0,024	0,152	0,009	1,50x10 ²	1,60 x10 ⁶	1,00 x10 ¹
5	0,016	0,167	0,268	5,00 x10 ¹	2,10 x10 ⁶	6,50 x10 ⁶
6	0,014	0,200	0,016	2,50 x10 ¹	4,00 x10 ⁶	7,00 x10 ¹
7	0,015	0,014	0,111	9,00 x10 ¹	1,00 x10 ²	1,10 x10 ⁶

CONCLUSIONES

La matriz óptima basado en alginato de sodio y quitosano mostraron propiedades interesantes para la encapsulación y conservación de un número adecuado del consorcio de microbiomas. Los resultados muestran que el polímero utilizado, basado en alginato de sodio y quitosano, es estable a los diferentes valores de pH de 4 a 7 y a las temperaturas de 20, 25 y 30 °C tanto en solución acuosa, salina y en un suelo agrícola, destacando las condiciones a un pH 5 a 30 °C, cuya liberación prolongada del microbioma fue del 26% del microbioma previamente encapsulado en un suelo agrícola del café. El estudio cinético evidencia una

liberación gradual del microbioma hasta las 72 horas, correspondiendo a un 32% de la población microbiana previamente encapsulada y su sobrevivencia del microbioma encapsulado luego de un mes a temperatura ambiente disminuyó un 8%. La matriz óptima mostro propiedades interesantes para la encapsulación y conservación de un número adecuado de microorganismos benéficos, sin embargo, se sugiere aplicar la metodología con diferentes cantidades del microbioma para ver su capacidad de carga y estudiar la estabilidad de las micropartículas en diferentes condiciones mediambientales.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto de inversión “Creación de la tecnología de encapsulado biodegradable de comunidades microbianas de suelos para la recuperación del

cultivo orgánico de café afectado por la roya amarilla en tres regiones productoras de selva del Perú (Cusco, Puno y Junín)”, SNIP N° 330468.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad, A., Riaz, S., & Tamiru, D. (2024). Alginate's ability to prevent metabolic illnesses, the degradation of the gut's protective layer, and alginate-based encapsulation methods. *Food Science and Nutrition*, 12, 8692-8714. <https://doi.org/10.1002/fsn3.4455>

Betancur, M., Echeverri, C. E., Londoño, M. E., & Moreno-Castellanos, N. (2025). Crosslinked Alginate-Chitosan Based Scaffold Functionalized with VEGF-A for the Beta-Pancreatic Cells Support. *Revista EIA*, 22(43), 1-24. <https://doi.org/10.24050/reia.v22i43.1838>

Beula, J., Balamurugan, A., Renuka, P., & Periyasamy, S. (2024). Chitosan-encapsulated microbial biofertilizer: A breakthrough for enhanced tomato crop productivity. *Revista internacional de macromoléculas biológicas*, 260, 129463, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129462>

Cáceres, L. M., Chamorro, E., & Dagnino, E. L. (2025). Microencapsulación de aceite esencial de pomelo en matrices de alginato-lignina y alginato-silice y modelado de su liberación controlada. *Revista Cubana de Química*, 37, 26-39. <https://doi.org/10.33414/ajea.5.732.2020>

Chamard, J., Faticov, M., Blanchet, F. G., Chagnon, P. L., & Laforest-Lapointe, I. (2024). Interplay of biotic and abiotic factors shapes tree seedling growth and root-associated microbial communities. *Communications biology*, 7, 360, 1-13. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06042-7>

Chandia, N.P., Matsuihiro, B., & Vásquez, A. E. (2001). Alginic acid in *Leesonía trabeculate*: characterization by formic acid hydrolysis and FTIR spectroscopy. *Carbohydrate polymer*, 46, 81-87. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00286-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00286-1)

- Chávez-Falcón, M. S., Buitrago-Arias, C., Avila-Reyes, S. V., Solorza-Feria, J., Arenas-Ocampo, M. L., Camacho-Díaz, B. H., & Jiménez-Aparicio, A. R. (2022). Kinetics and Mechanisms of *Saccharomyces boulardii* Release from Optimized Whey Protein-Agavin-Alginate Beads under Simulated Gastrointestinal Conditions. *Bioengineering*, 9, 460, 1-20. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9090460>
- Cong, X., Qingfeng, B., Wang, W., Hou, J., & Jiang, Z. (2022). Novel nano-encapsulated probiotic agents: Encapsulate materials, delivery, and encapsulation systems. *Journal of Controlled Release*, 349, 184-205. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.06.061>
- Cruz-Cárdenas, C. I., Zelaya, L.X., Sandoval, G., Villalobos, S., Rojas, E., Fernando, I., & Ruiz, S. (2021). Utilización de microorganismos para una agricultura sostenible en México: consideraciones y retos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(5), 899-913. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i5.2905>
- Da Silva Simões, C.V., Stamford, T. C. M., Berger, L. R. R., Araújo, A. S., Da Costa Medeiros, J. A., De Britto Lira Nogueira, M. C., Pintado, M. M. E., Salgado, S. M., & de Lima, M. A. B. (2025). Edible Alginate-Fungal Chitosan Coatings as Carriers for *Lactocaseibacillus casei* LC03 and Their Impact on Quality Parameters of Strawberries During Cold Storage. *Foods*, 14(2), 203. <https://doi.org/10.3390/foods14020203>
- Duraimurugan, P., Chandrika, K. S. V. P., Bharathi, E. & Neethu Ro, D. (2024). Encapsulation of *Bacillus thuringiensis* using sodium alginate and chitosan coacervates for insect-pest management. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 8, 100540, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2024.100540>
- El Hariri, M., Lasorsa, A., Sebakhy, K. O., Picchioni, F., & Van der Wel, P. C. A. (2022). Solid-state NMR spectroscopy insights for resolving different water pools in alginate hydrogels. *Food Hydrocolloids*, 127, 107500, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107500>
- Gómez L. F., Londoño M. E., & Echeverri C. E. (2018). Caracterización de matrices de polivinil alcohol-alginato-quitosano-aloe vera. *Revista Ingeniería Biomédica*, 12(23), 25-30. <https://doi.org/10.24050/19099762.n23.2018.806>
- Klein, M. P., Hackenhaar, C. R., Lorenzoni, A. S. G., Rodríguez, R. C., Costa, T. M. H., Ninow, J. L., & Hertz, P. F. (2016). Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β -D-galactosidase immobilization. *Carbohydrate Polymers*, 137, 184-190. <https://doi.org/10.1016/J.CARPOL.2015.10.069>
- Lewicka, K., Szymanek, I., Rogacz, D., Wrzalik, M., Łagiewka, J., Nowik-Zaj, A., Zawierucha, I., Coseri, S., Puiu, L., Falfushynska, H., & Rychter, P. (2024). Current Trends of Polymer Materials Application in Agriculture. *Sustainability*, 16, 8439. <https://doi.org/10.3390/su16198439>
- Matei, E., Predescu, A. M., Răpă, M., Țurcanu, A. A., Mateș, I., Constantín, N., & Predescu, C. (2022). Natural Polymers and Their Nanocomposites Used for Environmental Applications. *Nanomaterials*, 12, 1707. <https://doi.org/10.3390/nano12101707>
- Mollah, M. Z. I., Faruque, M. R. I., Bradley, D. A., Khndaker, M. U., & Al Assaf, S. (2023). FTIR and rheology study of alginate simples: Effect of radiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 202, 110500.
- Nair, M. S., Tomar, M., Punia, S., Kukula-Koch, W., & Kumar, M. (2020). Enhancing the functionality of chitosan- and alginate-based active edible coatings/films for the preservation of fruits and vegetables: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 304-320. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.083>
- Netherway, T., Bengtsson, J., Buegger, F., Fritscher, J., Oja, J., Pritsch, K., Hildebrand, F., Krab, E., & Bahram, M. (2024). Pervasive associations between dark septate endophytic fungi with tree root and soil microbiomes across Europe. *Nature Communications*, 15, 159. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44172-4>
- Philippot, L., Chenu, C., Kappler, A., Rillig, M. C., & Fierer, N. (2024). The interplay between microbial communities and soil properties. *Nature Reviews Microbiology*, 22, 226-239. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00980-5>
- Riseh, R. S., Skorik, Y. A., Thakur, V. K., Pour, M. M., Tamanadar, E., & Noghabi, S. S. (2021). Encapsulation of Plant Biocontrol Bacteria with Alginate as a Main Polymer Material. *International Journal of Molecular Science*, 22(20), 11165. <https://doi.org/10.3390/IJMS222011165>
- Rodríguez, N., Valderrama, A., Alarcón, H., & López, Al. (2010). Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76(4), 336-354.
- Sharif, N., Murtaza, I., Shahnaz, G., Saeed, A., Ishtiaq, A., Tabassum, S., Rahdar, A., Fathi-karkan, S., & Pandey, S. (2025). Precision nanophytomedicine: Alginate-chitosan nanogels encapsulating *Olea ferruginea* ethyl acetate fraction for enhanced cardiovascular protection. *International Journal of Biological Macromolecules*, 318, 144656, 1-22. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.144656>
- Tavares, L., Esparza Flores, E. E., Rodríguez, R. C., Hertz, P. F., & Noreña, C. P. Z. (2020). Effect of deacetylation degree of chitosan on rheological properties and physical chemical characteristics of genipin-crosslinked chitosan beads. *Food Hydrocolloids*, 106, 105876. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2020.105876>
- Thị-Thanh-Trúc, P., Hải-Ng'ũn, D., Ureña, M., Oliéte, B., Denimal, E., Dupont, E., Beney, L., & Karbowiak, T. (2025). Sodium Alginate as a promising encapsulating material for extremely-oxygen sensitive probiotics. *Food Hydrocolloids*, 160, 110857. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.110857>
- Trabelsi, I., Bejar, W., Ayadi, D., Chouayekh, H., Kammoun, R., Bejar, S., & Salah, R. (2013). Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved the survival of newly probiotic in oxgall and gastric juice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.06.035>
- Ureña, M., Carullo, D., Thanh-Trúc, P., Fournier, P., Farris, S., Lagorce, A., & Karbowiak, T. (2024). Effect of polymer structure on the functional properties of alginate for film or coating applications. *Food Hydrocolloids*, 149, 10955. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109557>
- Zhao, S., & Wang, J. (2025). Preparation of composites based on herbicide-degrading bacteria and their effects on soil bacterial communities. *The Microbe*, 6, 100234. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100234>
- Zveushe, K., Nkoh, J., Resco de Dios, V., Terence, T., Suanon, F., Zhang, H., Chen, W., Lin, L., Zhang, W., Sesu, F., Li, J., Han, Y., & Dong, F. (2025). Enhancing hexavalent chromium stable reduction via sodium alginate encapsulation of newly isolated fungal and bacterial consortia. *Journal of Hazardous Materials*, 486, 136994. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.136994>