

COMPOSICIÓN Y MÉTODO PARA INMOBILIZAR MICROORGANISMOS EN CÁPSULAS BIOPOLÍMICAS DE HIDROGEL

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con productos para el control biológico y la biofertilización de cultivos. En particular, la presente invención se refiere a composiciones de cápsulas de hidrogel en matrices poliméricas que protegen los ingredientes activos a procesos de secado, almacenamientos
10 prolongados, temperatura, acidez, salinidad, que preservan la actividad biológica, y generan una liberación dirigida y eficaz del ingrediente activo en el campo. Como ingredientes activos se refiere a bacterias, hongos y levaduras con capacidades para el control biológico de patógenos y/o biofertilización en cultivos.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En agricultura, el control biológico hace referencia al uso de diferentes organismos que solos o en combinación son capaces de disminuir los efectos que causa un patógeno sobre el crecimiento y/o
20 la productividad de un cultivo. Las interacciones que ocurren entre la planta, el patógeno, el organismo biocontrolador, además de las condiciones del ambiente en el cual se desarrolla esta interacción son transcendentales para dar un correcto manejo al problema fitosanitario.

Tal como es conocido en el arte, el objetivo central del uso de microorganismos biocontroladores es limitar la aplicación de agroquímicos, logrando cultivos amigables con el medio ambiente pero
25 que tengan una gran eficiencia y efectividad en el manejo del patógeno, es por esta razón que es indispensable el desarrollar biocontroladores capaces de permanecer viables y crecer en el espacio de la planta que es susceptible a la presencia del fitopatógeno.

30 Para la selección de un microorganismo biocontrolador, se debe buscar que este sea metabólicamente activo y que pueda ejercer su efecto protector de forma directa o indirecta, por ejemplo, a través de la producción de metabolitos o enzimas que inhiben el crecimiento del

patógeno, en la competencia por espacio y nutrientes o buscando estimular las defensas de la planta.

El éxito de un biocontrolador recae en la rigurosidad de su selección, pues en gran medida se determina a partir de la interacción con la planta y el fitopatógeno de interés. No obstante, muchas veces se evidencia que estos microorganismos no son capaces de tener altas tasas de supervivencia y su efectividad y viabilidad se ve directamente afectada a través de la exposición a gradientes de temperatura dañinos, pH, efecto de luz y competencia del suelo, así como por otras condiciones del entorno.

Por su parte, los fertilizantes son componentes importantes del manejo integrado de nutrientes y juegan un papel clave en la productividad y sustentabilidad del suelo. Actualmente, se vienen desarrollando técnicas que consisten en la utilización de nanofertilizantes capaces de liberar nutrientes controladamente, no obstante, se continúa empleando fertilizantes químicos que, aunque regulan el crecimiento y el desarrollo de las plantas la exposición de dichos fertilizantes sigue siendo un problema para el medio ambiente.

Otra tecnología utilizada es la aplicación de biofertilización, a través de abonos orgánicos, biodegradables, que contienen microorganismos, y aportan nutrientes, antibióticos, hormonas como auxinas, citoquininas y vitaminas que enriquecen la raíz. A pesar de implementar dichos fertilizantes benéficos para el medio ambiente, los resultados no logran igual y mucho menos mejorar el desempeño de los fertilizantes químicos.

A partir de lo anterior, la ingeniería de bioprocesos ha buscado la manera de obtener formulaciones que sean capaces de soportar el uso de microorganismos objetivos para el control biológico y la biofertilización no obstante, continúan presentándose diferentes desafíos que no han sido solucionados eficazmente, entre los que se pueden mencionar, la producción de composiciones que no son estables en el tiempo, la pérdida de sobrevivencia microbiana del producto durante la formulación y el almacenamiento, el poco control sobre la liberación gradual del ingrediente activo cuando la composición es usada, la inmovilización de los conidios, la mitigación del estrés abiótico y la baja protección de la composición a condiciones ambientales que disminuyen su viabilidad y actividad biológica, entre otros.

En la actualidad existen diferentes productos comerciales biológicos mixtos de dos o más ingredientes activos que no garantizan una estabilidad biológica o vida de anaquel en amplios rangos de temperatura y periodos de tiempo, no protegen efectivamente a los ingredientes activos de factores bióticos y abióticos presentes en el suelo y no son de fácil manipulación y/o aplicación para el agricultor. Por lo tanto, es de gran importancia lograr composiciones de formulaciones a base de sustratos de hidrogeles con dos o más ingredientes activos que permitan en gran medida mejorar la eficacia, efectividad y competitividad de productos biológicos

Así que si bien, se ha buscado desarrollar alternativas biológicas diferentes, no existen aún composiciones o procesos como los aquí descritos que solucionen los problemas del arte previo anteriormente mencionados y que generen una mayor preservación de la actividad biológica, la tolerancia a la desecación, la estabilidad durante el almacenamiento y una liberación dirigida eficaz del ingrediente activo en el campo incluso bajo déficit hídrico o nutricional.

A través de la selección adecuada del microorganismo, el vehículo y los aditivos tal como se propone en esta invención se busca además reducir la cantidad de principio activo requerida, aumentar la estabilidad y la vida útil de los microorganismos, disminuir las dosis de aplicación del producto terminado en campo y garantizar la liberación sostenida o gradual del principio activo.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una composición de cápsulas biopoliméricas de hidrogel a base de microorganismos benéficos (hongos filamentosos, bacterias y levaduras) con capacidades biocontroladoras de patógenos y biofertilizantes en cultivos.

Esta composición comprende una matriz polimérica como base para la formación de cápsulas por gelificación iónica en contacto con un agente entrecruzante seleccionado, alcanzando un formulado que potencia la resistencia del microorganismo (ingrediente activo) al secado, permitiendo que se tenga una concentración viable inicial para ejercer biocontrol o biofertilización.

De esta manera, en un aspecto de la invención, la composición comprende una cantidad efectiva del microorganismo benéfico en conjunto con una matriz biopolimérica que lo encapsula y/o inmoviliza. Dicha matriz biopolimérica comprende, en proporciones establecidas como mínimo, excipientes tales como un relleno, un protector de secado, un material con capacidades de intercambio catiónico, un polímero biodegradable, un agente entrecruzante y en algunos casos un hidrogel superabsorbente y retenedor de agua. De esta manera, se logra también que la composición mantenga un microorganismo viable durante su almacenamiento, incluso a altas temperaturas.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir una composición de cápsulas biopoliméricas de hidrogel a base de microorganismos benéficos (hongos filamentosos, bacterias y levaduras) con capacidades biocontroladoras de patógenos y biofertilizantes en cultivos.

Como parte de dicho método se producen la composición de cápsulas biopoliméricas de hidrogel. En particular, se ha desarrollado un proceso que obtiene un biopolímero de encapsulación, una matriz biopolimérica, la suspensión de un principio activo y la gelificación del agente entrecruzante.

En una modalidad preferida de la invención las cápsulas o perlas que contienen microorganismos se forman dispersando una suspensión celular en una reacción de gelificación iónica generadora, a través de la cual existen reacciones de reticulación y de encapsulación con diferentes componentes, permitiendo extender la vida útil, mejorar el rendimiento o la eficiencia de la inoculación, incluida la actividad biológica y la fácil aplicación.

De esta manera la presente invención se refiere a un método para producir cápsulas biopoliméricas de hidrogel a base de microorganismos benéficos. Este método comprende un proceso de gelificación iónica que permite la encapsulación de bioproductos microbianos. La gelificación iónica ocurre cuando una solución de un polímero aniónico que contiene un agente bioactivo se deja caer en una solución de reticulación que contienen cationes divalentes que luego causa la solidificación y la formación de una estructura rígida tridimensional que contiene agua como pueden ser las perlas o las cápsulas. Estas estructuras tridimensionales se pueden secar para mejorar las propiedades de almacenamiento y facilitar la uniformidad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Figura 1. Apariencia macroscópica de las partículas de capsulas de hidrogel inmovilizando *T. koningiopsis* de acuerdo con la presente invención.
- Figura 2. (%) de sobrevivencia al secado del hongo *T. koningiopsis* inmovilizado a través de diferentes formulaciones de cápsulas.
- Figura 3. Sobrevivencia al secado de Bacterias Gram-negativas *Rhizobium leguminosarium*, *Azospirillum brasilense* y *Herbaspirillum* sp. inmovilizados de acuerdo con la presente invención.
- Figura 4. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de sección transversal de acuerdo con la presente invención inmovilizando conidios del hongo *T. koningiopsis*, e incluyendo un hidrogel superabsorbente.
- Figura 5. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de sección transversal de acuerdo con la presente invención inmovilizando células de bacterias Gram-negativas. Respuesta en topografía a tres diferentes agentes entrecruzantes: Cloruro de Calcio, Lactato de Calcio, Gluconato de Calcio.
- Figura 6. Área bajo curvas de incidencia y progreso de severidad (AUDPC-INC y AUDPC-SEV, respectivamente) de la enfermedad del tizón de la vaina del arroz en respuesta a la aplicación de una modalidad de la presente invención que contienen conidios de *T. koningiopsis*.
- Figura 7. Metodología de inoculación de cápsulas y escala de severidad de *R. solani* en planta de arroz de acuerdo con composiciones de la presente invención.
- Figura 8. Peso seco de raíz y parte aérea de las plantas de arroz en cada tratamiento 70 días. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey $p \leq 0.05$.

Figura 9. Longitud de la raíz y parte aérea de las plantas de arroz en cada tratamiento 70 días. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey $p \leq 0.05$.

5 Figura 10A. Liberación de *T. koningiopsis* inmovilizando en cápsulas de hidrogel pH 5.8.

Figura 10B. Liberación de *T. koningiopsis* inmovilizando en cápsulas de hidrogel pH 6.5.

Figura 10C. Liberación de *T. koningiopsis* inmovilizando en cápsulas de hidrogel pH 7.

10

Figura 10D. Liberación de *T. koningiopsis* inmovilizando en cápsulas de hidrogel pH 7.4.

Figura 11. Distribución de tamaño de partícula de los prototipos de cápsulas de hidrogel inmovilizando *T. koningiopsis*.

15

Figura 12.A Estabilidad del principio activo de composiciones descritas de esta invención a partir de un consorcio de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) a base de *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium leguminosarum* y *Herbaspirillum* almacenados a $6 \pm 2^\circ\text{C}$.

20 Figura 12.B Estabilidad del principio activo de composiciones descritas de esta invención a partir de un consorcio de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) a base de *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium leguminosarum* y *Herbaspirillum* almacenados a $18 \pm 2^\circ\text{C}$.

Figura 13. Resultados de biomasa seca aérea y biomasa de raíz de composiciones descritas de esta invención a partir de un consorcio de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) a base de *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium leguminosarum* y *Herbaspirillum*.

25

Figura 14. Resultados de contenidos de Clorofila A y B de composiciones descritas de esta invención a partir de un consorcio de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) a base de *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium leguminosarum* y *Herbaspirillum*.

30

Figura 15. Resultados de la tolerancia inducida al estrés por sequía en *Guinea grass* de las composiciones descritas en esta invención a partir de un consorcio de bacterias a base de *Bacillus subtilis* y *Priestia megaterium*.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con productos para el control biológico y la biofertilización de cultivos. En particular, la presente invención se refiere a composiciones de cápsulas de hidrogel en
10 matrices poliméricas.

Acorde a lo anterior, la presente invención se refiere a una composición de cápsulas biopoliméricas de hidrogel a base de microorganismos con capacidades biocontroladoras de patógenos y biofertilizantes en cultivos. Donde la matriz polimérica comprende, en proporciones determinadas
15 excipientes tales como un relleno, un protector de secado, un material con capacidades de intercambio catiónico, un polímero biodegradable, un agente entrecruzante, entre otros.

Un primer aspecto de la invención corresponde a composiciones de cápsulas de hidrogel que comprenden un ingrediente activo en conjunto con una matriz polimérica, en donde dicha matriz
20 polimérica permite que el ingrediente activo sobreviva en condiciones adecuadas, soportando procesos de secado, almacenamientos por extensos periodos de tiempo, y generando mayor estabilidad al ingrediente activo.

En otro aspecto de la invención, dicha matriz polimérica después de la reacción de gelificación iónica con un agente entrecruzante permite que el ingrediente activo sobreviva a operaciones de secado, preferiblemente a secado convectivo, haciendo referencia a todas aquellas operaciones de secado
25 que involucran mecanismos convectivos. Por ejemplo, secado por lecho fluidizado, secado por tambor rotatorio, secado por bandejas, deshidratación en desecador con atmosfera controlada u otros procesos acordes para su fin. Además, la matriz polimérica de la presente invención le otorga
30 una buena estabilidad a la composición, permitiendo que la actividad del ingrediente activo se mantenga durante un largo periodo de tiempo, aun cuando la temperatura de almacenamiento sea

relativamente alta, por ejemplo, alrededor de los 30°C, o al emplear diferentes tipos de envases como frascos de polietileno o bolsas trilaminadas.

De acuerdo con la presente invención, el ingrediente activo corresponde a cualquier microorganismo fúngico, bacteria o levadura con capacidad para el biocontrol o biofertilización en cultivos. En efecto, cualquier género de hongos, bacteria o levadura que tenga la capacidad de promover el crecimiento en plantas y/o ejercer biocontrol sobre patógenos del suelo puede ser utilizado en la composición de acuerdo con la presente invención. Se considera que el microorganismo tenga estas facultades, correlacionado a la dependencia en su efectividad con la capacidad de competencia por nutrientes, producción de enzimas y/o inducir resistencia sistémica entre otras.

En este sentido, el ingrediente activo corresponde a cualquier microorganismo como hongo, bacteria, levadura o sus mezclas en un máximo de 5×10^9 estructuras de reproducción por gramo de cápsula seca. En otra modalidad preferida de la invención dicho ingrediente activo se selecciona de hongos filamentosos como *Trichoderma* sp., *Metharizium* sp., *Beauveria* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Cordyceps* sp., bacterias del tipo Gram-positiva o Gram-negativa como *Bacillus* sp., *Azospirillum* sp., *Herbaspirillum* sp., o *Rhizobium* sp., *Pseudomonas* sp., y levaduras acorde a *Rodotorula glutinis*, *Saccharomyces* sp. Dichos microorganismos con una actividad biológica que incluye promover crecimiento en plantas y/o control de patógenos.

En una modalidad preferida de la invención, la matriz polimérica comprende un relleno que permite extender la vida útil, mejorar el rendimiento e incrementar la eficiencia de la inoculación, en donde el relleno se selecciona del grupo que consiste en derivados de almidón, derivados de celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, biochar, carbón activado, caolín o combinaciones de estos. En una modalidad aún más preferida de la invención el relleno es seleccionado entre polidextrosa, celulosa microcristalina, silicatos, caolines, biochar o almidones, celulosas, derivados o combinaciones de estos. El relleno se encuentra entre el 0.01% y el 90% p/p en base seca de la matriz polimérica, más preferiblemente entre el 0.1% y el 90% p/p en base seca de la matriz polimérica, en una modalidad más preferida se encuentra entre el 1% y el 80% p/p en base seca de la matriz polimérica, más preferiblemente entre el 1 y el 75% p/p.

El relleno preferiblemente tiene un tamaño de partícula inferior a 800 micras con un contenido de humedad de 10 %, preferiblemente menor al 5%.

5 En otra modalidad de la invención, la matriz polimérica tiene un agente protector de secado, el agente protector de secado adecuado en cada formulación se relaciona directamente con el microorganismo a proteger y depende de la identidad del mismo microorganismo. Dicho agente permite aumentar la supervivencia celular y la vida útil del microorganismo, aún más mejora la escalabilidad dentro de los procesos de secado de las cápsulas. En una modalidad preferida de la invención, el agente protector de secado se encuentra en una proporción entre el 1% y el 90% p/p
10 base seca de la matriz polimérica, más preferiblemente entre el 1 y el 80% % p/p base seca de la matriz polimérica, en una modalidad aún más preferida entre el 5 y el 60% % p/p base seca de la matriz polimérica.

En una modalidad preferida de la invención el agente protector de secado se selecciona del grupo
15 un azúcar o derivado, una proteína o derivado, un almidón o derivado, silicato o derivado, preferiblemente, el agente protector de secado consiste en povidona, leche descremada en polvo, manitol, sorbitol, sacarosa, gelatina, proteína de suero de leche, pectina o combinaciones de los mismos.

20 En otra modalidad de la invención, la matriz polimérica puede contener un material con capacidades de intercambio catiónico, dicho material se encuentra en una proporción menor del 30% p/p de la matriz polimérica, preferiblemente menor al 20% p/p de la matriz polimérica, aun mas preferible en una proporción del 0.01% al 15% p/p de la matriz polimérica, más preferible aun entre el 1% y el 10% p/p de la matriz polimérica. Algunos materiales con capacidades de intercambio catiónico
25 preferidos de la invención corresponden a Biochar, carbón activado de origen vegetal o mineral, materia orgánica, arcilla, sustancias húmicas, coloides entre otros.

En otra modalidad preferida de la invención, la matriz polimérica puede contener un polímero biodegradable, dicho polímero incide directamente en la estructura de la cápsula, toda vez que la
30 tasa de liberación del ingrediente activo se encuentra correlacionado con la influencia y selección de dicho biopolímero. Además, en la estructura de la cápsula genera influencia en la protección del microorganismo benéfico para el secado, almacenamiento y control biológico.

En una modalidad de la invención el polímero biodegradable se selecciona del grupo que consiste en alginatos, pectinas y derivados, en una modalidad preferida de la invención se selecciona de ácido algínico, alginato de sodio, alginato de amonio, pectina, pectina amidada, derivados de alginato, derivados de pectina o combinaciones de los mismos. En donde el polímero biodegradable se encuentra en una proporción mayor al 0.01% y menor al 90% p/p de la matriz polimérica, preferiblemente entre el 1% y el 80% p/p de la matriz polimérica, aun mas preferiblemente entre el 1% y el 60% p/p de la matriz polimérica, preferiblemente entre el 1% y el 50% p/p de la matriz polimérica.

10

En una modalidad preferida de la invención, la matriz polimérica tiene un agente entrecruzante, en donde dicha matriz después de la reacción de gelificación iónica con el agente entrecruzante permite que el ingrediente activo sobreviva a operaciones de secado, en una modalidad preferida tales operaciones de secado convectivo hacen referencia a todas aquellas que involucran mecanismos convectivos de secado. Por ejemplo, secado por lecho fluidizado, secado por tambor rotatorio, secado por bandejas, deshidratación en desecador con atmosfera controlada u otros procesos acordes para su fin. La definición e identificación del agente entrecruzante adecuado es pertinente para mejorar la supervivencia celular, la vida útil y obtener un adecuado escalonamiento de los procesos de secado de las cápsulas.

20

En una modalidad preferida de la invención, el agente entrecruzante se selecciona del grupo que consiste en sales de calcio, sales de magnesio, sales de zinc, cloruro de calcio, lactato de calcio, gluconato de calcio o combinaciones de los mismos, en una modalidad aún más preferida el agente entrecruzante se selecciona de sales de calcio, zinc y magnesio, preferiblemente el agente entrecruzante se selecciona de cloruro de calcio, lactato de calcio, gluconato de calcio, sulfato de magnesio, sulfato de zinc o combinaciones de los mismos. En una modalidad aún más preferida de la invención el agente entrecruzante se selecciona, por ejemplo, cloruro de calcio, lactato de calcio, gluconato de Calcio, sulfato de magnesio, sulfato de zinc, en una modalidad aún más preferida de la invención el agente entrecruzante es Gluconato de Calcio.

30

En una modalidad preferida de la invención el agente entrecruzante tiene una concentración de entre 0.05 a 0.4 M.

En una modalidad de la invención, dicho agente entrecruzante tendrá hasta 30% p/p en base seca de la matriz polimérica, preferiblemente hasta el 25% en base seca de la matriz polimérica, más preferiblemente hasta el 20% p/p en base seca de la matriz polimérica, en una modalidad aún más preferida de la invención el agente entrecruzante varía entre el 1% y el 10 % p/p de la matriz polimérica en base seca.

En una modalidad aún más preferida de la invención, al momento de la preparación, el agente entrecruzante tiene una relación en volumen matriz polimérica: agente entrecruzante de 1:1, preferiblemente 1:4, más preferiblemente 1:3, aún más preferible 1:2.

En una modalidad preferida de la invención, las cápsulas contienen un hidrogel que permite absorber y retener el agua produciendo cambios importantes en las propiedades hidro-físicas del suelo. De acuerdo con esta invención los hidrogeles seleccionados aumentan notablemente la capacidad de retención del agua y disminuye su conductividad hidráulica. Aún más, a través de la capacidad de hinchamiento de estos hidrogeles seleccionados se descompone el suelo cuando está húmedo.

En una modalidad preferida de la invención el hidrogel corresponde a un derivado del polímero de ácido poliacrílico, poliacrilato de sodio, poliacrilato de potasio en una concentración. En una modalidad aún más preferida el derivado de ácido poliacrílico, como los alquilo acrilatos que corresponde a Carbopol, preferiblemente Carbopol Ultrez 20, más preferiblemente Carbopol Ultrez 10, o aún más preferiblemente Carbopol Ultrez 21. En otra modalidad de la invención el hidrogel se encuentra en una proporción del 0.1% al 10% relación peso/volumen con respecto a la matriz polimérica, en una modalidad aún más preferida entre el del 0.5% al 5% relación peso/volumen con respecto a la matriz polimérica.

En una modalidad preferida de la invención, la composición de cápsulas biopoliméricas de hidrogel se forma a base de microorganismos benéficos (ej. hongos filamentosos, bacterias y levaduras entre otros) con capacidades biocontroladoras de patógenos y/o biofertilizantes en cultivos. En efecto, cualquier género de hongos, bacteria o levadura que tenga la capacidad de promover crecimiento

en plantas y/o ejercer biocontrol sobre patógenos del suelo para ser utilizado en la composición de acuerdo con la presente invención.

En una modalidad aún más preferida la composición de la presente invención, que proporciona una matriz polimérica biodegradable conveniente, puede servir a cualquier especie perteneciente a géneros que tengan estas facultades, ya que su funcionalidad depende de la capacidad de competencia por nutrientes, producción de enzimas o inducir resistencia sistémica entre otras; capacidades que son comunes en estos microorganismos.

De acuerdo con lo anterior, cualquier especie perteneciente a tales géneros puede ser empleada en la composición de la presente invención. No obstante, en una modalidad preferida de la invención, el microorganismo fúngico es *Trichoderma sp*, *Metharizium sp.*, *Beauveria sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp*, *Cordyceps sp.*, *Duddingtonia flagrans*, *Arthrobotrys sp*, o *Fusarium sp*. La bacteria puede ser Gram-positiva o Gram-negativa como *Bacillus sp.*, *Azospirillum sp.*, *Herbaspirillum sp.* o *Rhizobioum sp.*, *Pseudomonas sp.*, levaduras como *Rodotorula glutinis.*, *Saccharomyces sp*.

En una modalidad de la invención la emulsión de recubrimiento desarrollada le permite al microorganismo liberarse en las mejores condiciones, bajo diferentes ambientes a los que se ve sometido durante su aplicación. Una vez allí, la matriz polimérica en forma de cápsula se desvanece sin impedir la efectividad del ingrediente activo, permitiéndole al microorganismo desarrollarse y ejercer su actividad. De esta manera, la aplicación de la composición de acuerdo con la presente invención reduce por ejemplo sustancialmente enfermedades ocasionadas por patógenos del suelo, presentando efecto contra ellas, entre los que se encuentran *R. solani* causante del añublo de la vaina en cultivo de arroz principalmente.

En un aspecto de la invención, la composición comprende una cantidad efectiva del microorganismo benéfico en conjunto con una matriz biopolimérica que lo encapsula y o inmoviliza. De esta manera, se logra también que la composición mantenga un microorganismo viable durante su almacenamiento, incluso a altas temperaturas, mantenga la preservación de la actividad biológica, la tolerancia a la desecación, la estabilidad durante el almacenamiento y una liberación dirigida eficaz del ingrediente activo en el campo.

En una modalidad de la invención, entre las estructuras de reproducción que pueden emplearse en la composición de la presente invención se encuentran esporas, conidios, células vegetativas principalmente. En una modalidad aún más preferida de la invención, la composición con el fin de ejercer biofertilización y/o biocontrol en cultivos comprende al menos 1×10^3 estructuras de reproducción del microorganismo por cápsula o perla. En una modalidad preferida de la invención la composición cuenta con al menos 1×10^5 estructuras de reproducción (células, esporas, conidios, clamidosporas entre otros) por cápsula o perla. En una modalidad preferida de la invención el principio activo comprende una concentración entre el 1×10^6 estructuras y el 5×10^9 estructuras de reproducción del microorganismo por cápsula o perla.

10

De acuerdo con las modalidades de esta invención, la estructura de las cápsulas permite una liberación del ingrediente activo en un mayor rango de pH, promueven el crecimiento en plantas, genera mayor actividad biológica del principio activo, aumentan la sobrevivencia de bacterias Gram-negativas y hongos filamentosos.

15

De acuerdo con esta invención la encapsulación permite la elaboración de portadores de microorganismos, por lo tanto, las células vivas encapsuladas están protegidas en un caparazón nutritivo contra el estrés mecánico y del entorno, como la temperatura, el pH, los solventes orgánicos, los depredadores y otros. Una vez que las cápsulas se ubican en el suelo, el microbioma del suelo las degrada activamente, lo que facilita que las células encapsuladas se liberen gradualmente hacia el suelo, generalmente a tasas de acuerdo con los tiempos de germinación de las semillas o la emergencia de las plántulas.

De acuerdo con las modalidades de esta invención, la composición se encuentra en forma de cápsulas de hidrogel secas, cápsulas de hidrogel húmedas, o incluidas en granulados, emulsiones, polvos, recubrimiento de semillas, granulado dispersable, polvo, polvo dispersable, capsulas, tabletas, pellets, emulsión o suspensión acuosa u oleosa. En un aspecto de la invención la composición en forma de cápsula tiene un tamaño de partícula entre 100 y 6000 μm .

Por otra parte, un aspecto de la invención corresponde a métodos para producir la composición de cápsulas biopoliméricas de hidrogel a base de microorganismos con capacidades biocontroladoras de patógenos y biofertilizantes en cultivos. En particular, se ha desarrollado un proceso que obtiene

un biopolímero de encapsulación, una matriz biopolimérica, la suspensión de un principio activo y la gelificación del agente entrecruzante. En una modalidad preferida de la invención las cápsulas o perlas que contienen microorganismos se forman dispersando una suspensión celular en una reacción de gelificación iónica generadora, a través de la cual existen reacciones de reticulación y de encapsulación con diferentes componentes que permiten extender la vida útil, mejorar el rendimiento o la eficiencia de la inoculación, incluida la actividad biológica y la fácil aplicación. En una modalidad preferida de la invención, el método para producir la composición descrita comprende los pasos de:

- 10 a) Disolver el biopolímero de encapsulación en agua hasta una concentración manteniendo agitación constante y temperatura controlado
- b) Preparar la matriz polimérica mezclando los rellenos y protectores de secado durante un periodo de tiempo determinado.
- c) Adición de un hidrogel superabsorbente como agente retenedor de agua
- 15 d) Agregar la suspensión de principio activo correspondiente a microorganismos benéficos como hongos filamentosos, bacterias, levadura, sus mezclas u otros manteniendo agitación constante.
- e) Gotear la matriz polimérica resultante anterior en la suspensión de un agente entrecruzante manteniendo la agitación constante.
- 20 f) Formar las cápsulas de hidrogel cuando entra en contacto la gota de matriz polimérica con el agente entrecruzante.
- g) Esperar por al menos un tiempo predeterminado la formación de las cápsulas de hidrogel en suspensión en el agente entrecruzante, una vez formadas son separarlas por un tamiz y lavadas con agua o solución salina.
- 25 h) Las cápsulas de llevan a operación de secado y/o deshidratación hasta obtener un contenido de humedad apropiado para su fin. Las operaciones de secado para la presente invención incluyen, en una modalidad preferida de la invención todas aquellas que involucran

mecanismos convectivos de secado. Por ejemplo, secado por lecho fluidizado, secado por tambor rotatorio, secado por bandejas, deshidratación en desecador con atmosfera controlada entre otras.

5 En una modalidad de la invención el biopolímero de encapsulación que es disuelto en agua se selecciona del grupo que consiste en alginatos, pectinas y derivados, en una modalidad preferida de la invención se selecciona de ácido algínico, alginato de sodio, alginato de amonio, pectina, pectina amidada, derivados de alginato, derivados de pectina o combinaciones de los mismos. En donde el polímero biodegradable se encuentra en una proporción mayor al 0.01% y menor al 90% p/p de la
10 matriz polimérica, preferiblemente entre el 1% y el 80% p/p de la matriz polimérica, aun mas preferiblemente entre el 1% y el 60% p/p de la matriz polimérica, preferiblemente entre el 1% y el 50% p/p de la matriz polimérica.

En una modalidad preferida de la invención el polímero disuelto alcanza una concentración final
15 mayor al 0.5%, preferiblemente mayor al 1%, más preferiblemente mayor al 1% y menor al 6%.

En una modalidad preferida de la invención, la disolución se obtiene con agitación mayor a 30 rpm y menor a 1000 rpm, preferiblemente mayor a 50 rpm y menor a 800 rpm.

En otra modalidad preferida, la matriz polimérica se obtiene mezclando los rellenos durante un
20 periodo de tiempo determinado. En una modalidad aún más preferida de la invención el relleno es seleccionado entre polidextrosa, celulosa microcristalina, silicatos, caolines, biochar o almidones, celulosas, derivados o combinaciones de estos. Mas preferiblemente el relleno puede ser mezclado en orden cronológico como polidextrosa o celulosa microcristalina o biochar, o almidones, celulosas o derivados. Mas preferiblemente, la mezcla se realiza en un periodo de tiempo mayor a 5 minutos
25 y menor a 60 minutos.

En otra modalidad preferida de la invención, se adiciona un hidrogel superabsorbente y retenedor de agua a la matriz polimérica. En una modalidad preferida de la invención el hidrogel corresponde a un derivado del polímero de ácido poliacrílico, poliacrilato de sodio, poliacrilato de potasio en una
30 concentración. En una modalidad aún más preferida el derivado de ácido poliacrílico corresponde a Carbopol, más preferiblemente Carbopol Ultrez 21. Preferiblemente el hidrogel se adiciona en una

concentración mayor al 0.1% p/v respecto la matriz polimérica, preferiblemente mayor al 0.5% y menor al 5% p/v.

- En otra modalidad preferida de la invención, se agrega una suspensión de un principio activo a la matriz polimérica que corresponde a microorganismos como hongos filamentosos, bacterias, levadura, sus mezclas, entre otros. En una modalidad preferida de la invención el principio activo se adiciona en una concentración máxima de estructuras de reproducción por mililitro de 2×10^{10} , en una modalidad aún más preferida la concentración es preferible de 2×10^9 estructuras de reproducción por mililitro, o aún más preferible de 2×10^8 estructuras de reproducción por mililitro.
- En otra modalidad preferida de la invención, se gotea la matriz polimérica resultante en la suspensión de agente entrecruzante, donde el agente entrecruzante puede ser uno o varias sales de calcio, sales de magnesio, sales de zinc, cloruro de calcio, lactato de calcio, gluconato de calcio o combinaciones de los mismos, Mas preferiblemente, el agente entrecruzante es gluconato de calcio. El agente entrecruzante tiene una relación en volumen matriz polimérica: agente entrecruzante comprendida entre 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, más preferiblemente 1:4, más preferiblemente 1:3, aún más preferible 1:2.

En una modalidad de la invención, las cápsulas se forman en el contacto gota a gota de la matriz polimérica con el agente entrecruzante y estas se dejan al menos 7 minutos en suspensión, preferiblemente al menos 10 minutos en suspensión.

- En una modalidad preferida de la invención las cápsulas son secadas por una operación de secado, en una modalidad preferida de la invención se realiza secado por convección, aún más preferida las operaciones de secado corresponden a secado por lecho fluidizado, secado por tambor rotatorio, secado por bandejas, deshidratación en desecador con atmosfera controlada o cualquier tipo de secado oportuno para su fin, hasta alcanzar humedades mayores al 0.1% y menores al 98%, más preferiblemente una humedad relativa menor al 90%, en una modalidad preferida la humedad relativa es menor al 20% (Figura 1).

- Lo anterior, junto con los pasos de adicionar los excipientes descritos anteriormente, en las proporciones especificadas, permite obtener la composición con las ventajas que han sido expuestas, y producirla a gran escala.

De esta manera a partir de las modalidades descritas de la invención, se permite solucionar los problemas técnicos de la obtención de cápsulas de hidrogel que permiten aumentar la estabilidad en almacenamiento del principio activo de los microorganismos benéficos, permitiendo vidas útiles superiores en el almacenamiento, transporte o cualquier disposición de la formulación, alcanzando vida útil superior a 10 meses con temperaturas alrededor de 8°C, vida útil superior a 6 meses a temperaturas que oscilan los 18°C y vida útil superior de 4 meses a temperaturas cercanas a los 28°C- (Tabla 2). Adicionalmente, la presente invención mantiene concentraciones superiores a 1.0×10^6 células por cápsula en las condiciones anteriormente descritas y permitiendo una sobrevivencia del principio activo (*Trichoderma* sp.), con valores superiores al 70%, incluso superiores al 85.86%, incluso logrando valores hasta el 98% (Figura 2).

Más allá de la protección celular proporcionada por el material encapsulante, se han descrito muchas ventajas de atrapar las células en diferentes condiciones, especialmente en aplicaciones de almacenamiento y de aplicación única en campo. Los procesos de atrapamiento principalmente no son estresantes para las células, se realizan con portadores biodegradables y no tóxicos y se llevan a cabo en ambientes asépticos minimizando la contaminación. En cuanto a que las cápsulas están altamente concentradas, su volumen es ventajoso, limitando el espacio de almacenamiento, transporte y manipulación de la formulación obtenida. Las cápsulas de tamaño como la presente en esta invención permiten que las células liberadas se muevan a través del suelo hacia las plantas propiciando una fertilización económica y de precisión.

Dentro de otras modalidades de la invención, las cápsulas y sus composiciones pueden preservar/conservar la viabilidad de microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) en condiciones criogénicas, de refrigeración bajo temperatura ambiente o expuestas a choques térmicos de temperaturas de hasta 70°C.

Adicionalmente, dentro de otras modalidades de la invención, las cápsulas y sus composiciones pueden ser usados en biorreactores de lecho empacado, para biosíntesis de metabolitos y enzimas, biorremediación de aguas y suelos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Concentración, viabilidad después de secado

- 5 Se pusieron a prueba diferentes prototipos de cápsulas de hidrogel de acuerdo con las modalidades de esta invención tal como los descritos en la Tabla 1, inmovilizando conidios de *T. koningiopsis*, los principios activos empleados correspondieron a conidios de hongos filamentosos: *Trichoderma sp.*, *Beauveria sp.*, *Lecanicillium sp.*, *Metharizium sp.*, etc. Bacterias: *Bacillus sp.*, *Azotobacter sp.*, *Rhizobium sp.* etc. y Levaduras: *Rodotorulla sp.*, *Meyerozyma sp.* etc.

10

Tabla 1

	P1		P2		P3		P4	
Componente	B. Húmeda	B. Seca	B. Húmeda	B. Seca	B. Húmeda	B. Seca	B. Húmeda	B. Seca
Alginato	1.0%-6,0%	5.0- 50%	1.0%-6,0%	5.0- 50%				
Pectina Amidada					1.0%-6,0%	5.0- 50%	1.0%-6,0%	5.0- 50%
Polidextrosa	1.0%- 5.0%	5.0- 60,0%					1.0%- 5.0%	5.0- 60,0%
Celulosa microcristalina			1.0%- 5.0%	5.0- 60,0%	1.0%- 5.0%	5.0- 60,0%		
Biochar	0.1%-2.0%	1.0%-15%	0.1%-2.0%	1.0%-15%	0.1%-2.0%	1.0%-15%	0.1%-2.0%	1.0%-15%
(PA)	1.0%-20%	0.5%-20%	1.0%-20%	0.5%-20%	1.0%-20%	0.5%-20%	1.0%-20%	0.5%-20%
Agua en Matriz	40%-90%		40%-90%		40%-90%		40%-90%	
Entrecruzante Gluconato de Calcio [0.05 a 0.2 M] Relación 2:1 en Volumen (Entrecruzante: matriz)								

	P5		P6		P7		P8	
Componente	B. Húmeda	B. Seca	B. Húmeda	B. Seca	B. Húmeda	B. Seca	B. Húmeda	B. Seca
Alginato								
Pectina Amidada	1.0%-6,0%	5.0- 50%	1.0%-6,0%	5.0- 50%	1.0%-6,0%	5.0- 50%	1.0%-6,0%	5.0- 50%
Polidextrosa	1.0%- 5.0%	5.0- 60,0%	1.0%- 5.0%	5.0- 60,0%	1.0%- 5.0%	5.0- 60,0%	1.0%- 5.0%	5.0- 60,0%
celulosa microcristalina	1.0%- 5.0%	5.0- 60,0%	1.0%- 5.0%	5.0- 60,0%	1.0%- 5.0%	5.0- 60,0%		
Biochar	0.1%-2.0%	1.0%-15%	0.1%-2.0%	1.0%-15%	0.1%-2.0%	1.0%-15%	0.1%-2.0%	1.0%-15%
Hidrogel poliacrilato	1.5 %	0.1%-15%	3%	0.1%-15%	1.0 %	0.1%-15%	1.0 %	0.1%-15%
(PA)	1.0%-20%	0.5%-20%	1.0%-20%	0.5%-20%	1.0%-20%	0.5%-20%	1.0%-20%	0.5%-20%
Agua en Matriz	40%-90%		40%-90%		40%-90%		40%-90%	
Entrecruzante Gluconato de Calcio [0.05 a 0.2 M] Relación 2:1 en Volumen					Lactato de Calcio [0.05 a 0.2 M] Relación 2:1 en Volumen			

	P9		P10		P11	
Componente	B. Húmeda	B. Seca	B. Húmeda	B. Seca	B. Húmeda	B. Seca
Alginato						
Pectina Amidada	1.0%-6,0%	5.0- 50%	1.0%-6,0%	5.0- 50%	1.0%-6,0%	5.0- 50%
Polidextrosa	1.0%- 5.0%	5.0- 60,0%	1.0%- 5.0%	5.0- 60,0%	1.0%- 5.0%	5.0- 60,0%

Celulosa microcristalina	1.0%- 5.0%	5.0- 60,0%	1.0%- 5.0%	5.0- 60,0%	1.0%- 5.0%	5.0- 60,0%
Biochar	0.1%-2.0%	1.0%-15%	0.1%-2.0%	1.0%-15%	0.1%-2.0%	1.0%-15%
Hidrogel poliacrilato	1.0 %	0.1%-15%	1.0 %	0.1%-15%	1.0 %	0.1%-15%
Goma Xantano	1.0 %	0.1%-15%				
Goma Guar			1.0 %	0.1%-15%		
Goma Acacia					1.0 %	0.1%-15%
(PA)	1.0%-20%	0.5%-20%	1.0%-20%	0.5%-20%	1.0%-20%	0.5%-20%
Agua en Matriz	40%-90%		40%-90%		40%-90%	
Entrecruzante Gluconato de Calcio [0.05 a 0.2 M] Relación 2:1 en Volumen						

A partir de los diferentes prototipos propuestos y evaluando el comportamiento del principio activo en cada uno ellos, sorprendentemente se pudo determinar que las cápsulas descritas en esta invención pueden proveer sobrevivencia al secado del principio activo con valores superiores al 70%, incluso superiores al 85.86%, incluso logrando valores hasta el 98%.

5

Tal como se puede ver en la Figura 2 los prototipos P2, P4 y P7 del hongo *T. koningiopsis* de acuerdo con las modalidades descritas en esta invención tienen tasas de sobrevivencia al secado superiores al 75%. Por su parte en la Figura 3, se puede observar los resultados de sobrevivencia al secado de Bacterias Gram-negativas *Rhizobium leguminosarium*, *Azospirillum brasilense* y *Herbaspirillum* sp, inmovilizados de acuerdo con la presente invención.

10

En la Figura 4, para las modalidades favoritas de la invención y junto con la adición del hidrogel a través de las microscopias realizadas se puede apreciar la aglomeración de los conidios en *clúster* densos permitiendo identificar porque los conidios soportan las condiciones de desecación y facilitando generar mayor supervivencia y viabilidad del principio activo.

15

Como parte de la evaluación de las características de las modalidades de la invención y partiendo del prototipo P3 se decidió evaluar la inclusión de un hidrogel superabsorbente derivado del ácido poliacrílico, en este caso de Polímero de ácido poliacrílico (Carbopol Ultrez 21), en concentraciones de 0.5% al 5.0% p/v en la matriz, con esta formulación (P7) que permitió demostrar que la adición de este componente favoreció la activación de la cápsula, aprovechando su capacidad de absorción y la acumulación de agua de estos materiales. Además, la adición de dicho polímero incrementa significativamente la sobrevivencia de los conidios después del secado, llegando a recuperar hasta el 98,34% de los conidios.

20

25

Ejemplo 2. Actividad Biológica contra *R. solani*

A través de las modalidades preferidas de la presente invención y en la evaluación de la actividad biológica del mismo contra la *Rhizoctonia Solani* se diseñó el siguiente experimento en el cual se evaluaron: i) dos prototipos de encapsulados de acuerdo con las modalidades de esta invención, ii) dos muestras “carriers” de encapsulados a base de los auxiliares de la formulación de cada prototipo sin adición de *T. koningiopsis* ,iii) dos tratamientos biofungicidas comerciales de acuerdo a sus instrucciones de uso TRICOTEC® WG (1 g L⁻¹ = 1x10⁶ conidios mL⁻¹ de y 50 mL por maceta) aplicado una vez en la siembra de semillas de arroz (TRICOTEC-S), iv) el fungicida químico THIFLUZAMIDE (1,5 mL L⁻¹) rociado a los 30 y 45 días después de la emergencia de las plántulas , v) una muestra “control” de la plantas de arroz cultivadas sin tratamientos contra la enfermedad, vi) un control negativo y un testigo absoluto.

Las semillas de arroz (libres de tratamiento biológico y libres de fungicida) se sembraron directamente en el suelo inoculado artificialmente con *Rhizoctonia Solani* cepa Rh002, distribuyendo 10 semillas por maceta. Cada semilla fue dispuesta sobre dos cápsulas de cada prototipo y de los carriers (Figura 7). Las plantas fueron mantenidas en inundación a partir de los 20 días después de emergencia y se procuró mantener una humedad relativa en el ambiente foliar alrededor del 90%, mientras que la temperatura del aire en el invernadero fue de 25 °C en promedio.

De los resultados obtenidos luego de esta evaluación, se puede decir que los prototipos fabricados a base de los auxiliares de formulación, con la adición del principio activo del hongo *T. koningiopsis* mostraron una eficacia promedio en contra del patógeno *Rhizoctonia solani* entre 61 y 100%, previniendo la enfermedad añublo de la vaina. Por su parte, las cápsulas de hidrogel “carriers” biopoliméricas tuvieron una buena aceptación para controladores biológicos y agentes promotores de crecimiento, identificando de manera sorprendente que incluso los auxiliares de formulación pueden tener actividad antagónica contra patógenos de cultivos.

Como podemos observar en la Figura 6, se identifica la incidencia (AUDPC-INC) y progreso de severidad (AUDPC-SEV), de la enfermedad del tizón de la vaina del arroz en respuesta a la aplicación de nuevos prototipos de microcápsulas que contienen conidios de *T. koningiopsis*. Las columnas con la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de rango múltiple de Duncan

para cada variable ($\alpha = 0.05$). Las barras en la parte superior de las columnas representan el error estándar de los datos ($n = 6$).

5 A partir de este experimento se evidenció que al utilizar la formulación P4 descrita en la tabla 1, la planta de arroz presentó menor incidencia y severidad a la enfermedad del tizón de la vaina en comparación con los productos empleados en el mercado como TRICOTEC® WG y el fungicida THIFLUZAMIDE, la formulación de acuerdo con esta invención mostró una disminución considerable en las manchas y una respuesta favorecedora en el tiempo. En relación con la aplicación de la composición descrita como P1 también se puede notar que la severidad de afectación de esta
10 enfermedad en la planta se ve disminuida en comparación con las demás muestras comerciales.

Ejemplo 3. Liberación controlada del PA

La velocidad de liberación de las esporas de *T. koningiopsis* para las cuatro formulaciones de microencapsulación (P1, P3, P4 y P7), se realizó evaluando diferentes pH durante 72 horas. Para
15 esto, una muestra compuesta por 10 cápsulas secas de cada prototipo se adicionó a un Erlenmeyer que contenían 50 mL de buffer fosfato estéril ajustado a los pH de 5.8, 6.5, 7.0 y 7.4. Los Erlenmeyer inoculados se incubaron a 25°C con agitación continua a 150 rpm durante 72 horas. Después de 1, 5, 24, 48 y 72 horas de incubación, se tomó 1 mL de la muestra y se realizaron diluciones seriadas
20 1:5 hasta 10^{-5} . A partir de cada dilución, se sembraron 100 μ L sobre medio Agar PDA suplementado con 0,1 % Triton®100X. Las cajas inoculadas se incubaron a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas y finalizado el periodo de incubación, se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia.

A partir de las observaciones realizadas con las cápsulas de hidrogel según las modalidades de la
25 presente invención, y evaluando la liberación del Principio Activo, se pudo evidenciar la relación que se tiene en función del pH del buffer circundante. Se puede decir que tiene una amplia liberación en función del pH.

Definiendo y estableciendo los rangos de valores de pH entre 5.8 a 7.4 las cápsulas liberaron el
30 principio activo, en periodo de tiempo inferior a 72 h, tal como se puede observar en las Figura 10 A la 10 D. Al adicionar el hidrogel en P7 para este ejemplo Carbopol se pudo observar que el principio activo tuvo facilidad de liberarse, inclusive en pH relativamente ácidos (pH 5,8),

estableciendo que es más conveniente el uso de pH ácidos para surtir los mejores efectos de liberación controlada.

Analizando las demás variables de proceso en estas condiciones de las cápsulas, se puede señalar que la liberación de conidios en menor tiempo puede atribuirse a la absorción de agua por los grupos hidrófilos de la molécula, generando así la hinchazón de la matriz, siendo pertinente señalar que a medida que la red absorbe agua y crece, el gel comienza a desintegrarse y disolverse, liberando así, los conidios.

Ejemplo 4. Estabilidad de la composición durante el almacenamiento

A partir de la tabla 2 se muestra el comportamiento de las formulaciones diseñadas y seleccionadas (P1, P2, P3 y P4), evaluando las condiciones de las cápsulas en el almacenamiento y variando las temperaturas de 8 °C, 18 °C y 28 °C.

Tabla 2

Prototipos	Temperatura de almacenamiento	Tiempo de almacenamiento (meses)				
		0	1	2	3	6 MESES
P1	8°C	3,40E+06	3,23E+06	4,78E+06	1,00E+06	1,35E+06
	18°C	3,40E+06	2,47E+06	1,45E+06	5,98E+05	2,73E+05
	28°C	3,40E+06	1,68E+06	2,78E+05	3,52E+05	2,08E+05
P2	8°C	1,78E+05	2,77E+05	1,22E+05	6,50E+04	5,00E+04
	18°C	1,78E+05	4,18E+05	6,28E+04	5,22E+04	4,55E+04
	28°C	1,78E+05	2,52E+05	9,50E+04	1,85E+04	1,70E+04
P3	8°C	7,45E+06	5,57E+06	5,02E+06	4,63E+06	4,03E+06
	18°C	7,45E+06	5,15E+06	2,75E+06	1,23E+06	2,23E+06
	28°C	7,45E+06	2,50E+06	1,36E+06	2,80E+05	3,03E+04
P4	8°C	4,78E+06	3,40E+06	2,75E+06	2,38E+06	1,97E+06
	18°C	4,78E+06	2,28E+06	2,50E+06	1,52E+06	3,22E+05
	28°C	4,78E+06	2,38E+06	3,20E+05	4,55E+04	1,57E+03

De los resultados encontrados en este ensayo, se determinó que las cápsulas de hidrogel desarrolladas en cada uno de los prototipos permiten aumentar la estabilidad en almacenamiento del principio activo con vidas útiles superiores a 6 meses manteniendo concentraciones superiores a 1.0 x 10⁶ células/cápsula.

Ejemplo 5. Promoción de crecimiento de la composición en cultivo de arroz

Se evaluaron las formulaciones de encapsulados poliméricos P1, P3, P4 y P7, seleccionados previamente con tres kilogramos de suelo estéril humedecido, se depositaron a una profundidad de 1.5 cm dos cápsulas de cada uno de los prototipos y sobre estas se dispuso una semilla de arroz. Se contó adicionalmente con semillas sin tratar, fertilizando las plántulas obtenidas después de 45 días, con un régimen de fertilización del 50% (Frt 50%) y 100% (Frt 100%) aplicando un fertilizante a base de N 12.4%; P₂O₅ 11.4%; K₂O 17.7%; MgO 2.65%; S 8%; SO₃ 2.5%; B 0.015%; Fe 0.2%; Mn 0.02% y Zn 0.02%. Igualmente, se contó dos tratamientos en los que se aplicó el bioplaguicida TRICOTEC® el cual es a base de *T. koningiopsis*, uno aplicado al momento de la siembra y otro aplicado según el esquema de aplicación recomendado para arroz.

Se dispusieron por un período de 70 días, pasado este tiempo se realizó para la tercera parte de la población la medición de la longitud del sistema radicular y de la parte aérea de las plantas, así como la cuantificación del peso seco del sistema radicular y de la parte aérea de las plantas. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$), empleando el software estadístico Statistix 10.0 (Analytical Software, Florida, USA).

A partir de las modalidades de la invención, y a través del diseño de las cápsulas aquí desarrolladas, se logra encontrar que estas cápsulas logran funcionar con microorganismos promotores de crecimiento en plantas para este ejemplo *T. koningiopsis*, generando incrementos en el sistema de arroz, como longitud de raíz y la variable peso seco aéreo superior al 30%, habiendo sido mejor a los tratamientos de fertilización química tal como se puede ver en la Figura 7, Figura 8 y Figura 9.

Hay que decir, que se evidenció que los hidrogeles en las cápsulas descritos en las modalidades de esta invención pueden producir cambios importantes en las propiedades hidro-físicas del suelo, debido a que aumentan notablemente la capacidad de retención del agua y disminuye su conductividad hidráulica. Por otra parte, la capacidad de hinchamiento de estos hidrogeles como el Carbopol tiende a des compactar el suelo cuando está húmedo.

El tamaño de partícula de los prototipos secos varió entre 100 μm y 6000 μm , con un rango preferible entre 600 μm y 2000 μm siguiendo una distribución normal de tamaño (Figura 11).

Ejemplo 6. Evaluación de la estabilidad y grado de fertilización de formulaciones a base de un consorcio bacteriano

5 Se realizó un ensayo para evaluar las condiciones físicas, químicas, microbiológicas y la actividad biológica de acuerdo con las modalidades descritas de esta invención a partir de un consorcio de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) a base de *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium leguminosarum* y *Herbaspirillum* sp., la proporción de las bacterias para cada formulación descrita se puede apreciar en la tabla 3. Por su parte, los excipientes empleados en la formulación para cada
10 modalidad se encuentran detallado en la tabla 4 y la morfología de las cápsulas con las bacterias inmovilizadas en la figura 5.

Tabla 3

	Ps01	Ps10	Gr01
BACTERIA	(Leche descremada)	(Proteína de suero)	(Gelatina/Pectina) *
<i>Azospirillum brasilense</i> (%)	50,5	55,0	56,2
<i>Rhizobium leguminosarum</i> (%)	46,7	42,5	40,4
<i>Herbaspirillum</i> sp. (%)	2,8	2,6	3,4

*Proporción (1:1)

15 Las capsulas formuladas fueron almacenadas en bolsas pequeñas metalizadas sin sellado al vacío, y la variable evaluada fue la viabilidad de cada una de las bacterias en el tiempo (UFC/cápsula). Se almacenaron a 2 temperaturas diferentes a $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se hicieron evaluaciones continuas en los periodos de tiempo de 0, 0.5, 1, 2 y 3 meses.

20 Los resultados de estabilidad se pueden apreciar en las figuras 12A y 12B, donde vale la pena destacar que la mayor cantidad de principio activo por cápsula de los tipos de bacterias *Azospirillum brasilense* y *Rhizobium leguminosarum* se evidenció en la formulación "Ps01", para el caso específico de la bacteria *Herbaspirillum* la estabilidad del principio activo a temperatura $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$ se mantuvo
25 en las formulaciones Ps01 y Gr01.

Ahora bien, a partir de las formulaciones descritas, se realizó un ensayo en invernadero con *avena forrajera* (*Avena sativa*) para evidenciar el aumento de la promoción de crecimiento vegetal de las plantas, para lo cual se evaluaron 8 tratamientos tal como se presentan en la Tabla 4, como sustrato general en todos los tratamientos en cada materia se colocaron 740 g de una mezcla de vermiculita y arena de río en una proporción de 2:1.

Tal como se encuentra descrito en la Tabla 5, se dispusieron tres tratamientos control (T1), (T2) y (T3) modificando la adición o no de compost y la cantidad de nutriente. Se dispuso un tratamiento (T4) con una suspensión del consorcio bacteriano de células libres sin formular, tres tratamientos con las composiciones descritas en la Tabla 4, a los tratamientos que incluyeron compost se les agregó 92 g de previamente molido. Posteriormente se mezcló muy bien el sustrato y se procedió a humedecer, se abrió un agujero en el sustrato y se colocaron 1,2 g de semillas de *Avena sativa* previamente desinfectadas.

Para los tratamientos con los prototipos encapsulados se colocaron 1,2 g de cápsulas que contenían una concentración mínima de bacterias totales de $6,24 \times 10^8$ UFC/g, resultando del total de la materia una concentración de $1,0 \times 10^6$ UFC/g. Se adicionó agua y se fertilizó una vez en la semana todos los tratamientos, dependiendo si se debía adicionar la solución nutritiva Hoagland completo o Hoagland a la mitad, en un periodo de tiempo de 45 días.

Tabla 4

Excipientes de formulación	Ps01		Ps10		Gr01	
	% p/p (base seca)	% p/p (base húmeda)	% p/p (base seca)	% p/p (base húmeda)	% p/p (base seca)	% p/p (base húmeda)
Pectina amidada (GE: 31%, GA: 19%) *	4%	26,49%	4%	26,49%	4%	26,49%
Celulosa microcristalina	5%	33,11%	5%	33,11%	5%	33,11%
Polidextrosa	5%	33,11%	5%	33,11%	5%	33,11%
Biochar	0,1%	0,66%	0,1%	0,66%	0,1%	0,66%
Consortio Bacteriano	30%	0.40%	30%	0. 4%	30%	0.40%
Leche descremada	1%	6,62%	-	-	-	-
Proteína de suero	-	-	1%	6,62%	-	-

Gelatina/pectina 1:1	-	-	-	-	1%	6,62%
----------------------	---	---	---	---	----	-------

Para evaluar el comportamiento del crecimiento vegetal, se evaluó de manera independiente la biomasa seca aérea y la de raíz y se cuantificaron los diferentes pigmentos (Clorofila A, Clorofila B y Carotenoides).

A partir de los resultados se puede señalar que formulaciones descritas con las modalidades de la invención lograron tener mayor cantidad en gramos de biomasa seca aérea, alcanzando valores alrededor de 6 gramos de biomasa seca siendo mucho mejor que los resultados de los tratamientos control en las mismas condiciones que no superaron los 5 gramos. Ahora bien, respecto a la biomasa seca presente en la raíz, el aumento es sorprendentemente mayor alcanzando una cantidad de biomasa seca de alrededor 15.5 gramos equivalente a un poco más del 60% de gramos de biomasa seca de raíz en los tratamientos de control, este es un buen indicativo que las formulaciones descritas en esta invención tienen un efecto estimulador de la fertilización en los tratamientos probados (Figura 13).

Por otra parte, al identificar si los contenidos de clorofila A y B fueron influenciados por la aplicación de los tratamientos de las modalidades preferidas, se encontró que el contenido de clorofila A para el tratamiento 6 (T6) fue el más alto siendo de 3 µg/mL, seguido del tratamiento 5 (T5) ambos generados a partir de las formulaciones de acuerdo con esta invención (Figura 14). Ahora bien, el contenido de Clorofila B también se evidencio en mayor proporción en los tratamientos que incluían las modalidades preferidas de la invención, para este caso alcanzando el 1.2 µg/ml el tratamiento (T5), seguido del tratamiento (T7) y finalmente con un valor también superior a los tratamientos control el (T4). Esto implica que el aumento del contenido de pigmentos fotosintéticos en las hojas indica la eficiencia de la fertilización, aumentando el contenido de carbohidratos y proteínas solubles totales, lo que podría potenciar el crecimiento en condiciones de campo.

Tratamientos	Biomasa aérea kg /hectárea	Proteína cruda kg/hectárea	Nitrógeno kg/hectárea	Fósforo kg /hectárea	Potasio kg /hectárea
T1: Control (sin compost + HC)	122,8 ±10,42	9,88 ± 0,73	1,58± 0,11	0,14±0,001	3,86 ± 0,30
T2: Control 2 (compost + HC)	538,2±40,8 bc	45,5± 6,2 b	7,2±1,0 c	0,78±0,04 a	16,9±1,6 c
T3: Control 3 (Con compost + HM)	524,9±6,8 c	40,6±6,2 c	6,5±1,0 c	0,78±0,06 a	17,2±1,24 c
T4: Suspensión Bacteriana (compost + HM)	570,3±49,1 abc	48,3±19,1 bc	7,74±3,05 bc	0,87±0,10 a	16,6±2,49 c
T5: P1 (Ps01) (compost + HM)	589,9±21,12 ab	63,5±8,52 ab	10,1±1,36 ab	0,89±0,23 a	20,3±2,02 ab
T6: P2 (Ps10) (compost + HM)	589,6± 6,65 ab	73,6±2,85 a	11,7±0,45 a	0,84±0,14 a	22,1±0,69 a
T7: P3 (Gr01) (compost + HM)	609,5±24,50 a	52,3±9,83 bc	8,37±1,57 bc	0,93±0,03 a	20,1±2,47 ab

Tabla 5

* HC: Hoagland completo, HM: Hoagland a la mitad (n=3)

5

Ejemplo 6: Efecto de la inoculación de un consorcio de bacterias inmovilizadas en capsulas de hidrogel de alginato en la tolerancia inducida al estrés por sequía en Guinea Grass.

10

Se realizó un experimento en materas con capacidad de 2 kg de suelo no estéril, con cinco tratamientos de acuerdo con las modalidades descritas en esta invención y cinco replicas por cada uno. La inoculación de los experimentos se realizó al día 15 después de la germinación de las semillas de Guinea Grass. Para el caldo bacteriano se inocularon 5 ml del consorcio de bacterias Gram-positivas compuesto por *Bacillus subtilis* + *Priestia megaterium* ($\sim 1.4 \times 10^8$ UFC / ml). Para los

15 tratamientos con cápsulas de hidrogel de alginato con *Bacillus subtilis* + *Priestia megaterium* se aplicaron (1g) correspondiente a (3×10^8 UFC/ml) a 1 g de semillas de Guinea Grass. Los cuatro tratamientos excepto el tratamiento irrigado fue sometidos a estrés severo durante 10 días.

Los resultados demuestran que la composición de la formulación para inmovilizar dos bacterias (*Bacillus subtilis* + *Priestia megaterium*) tiene la capacidad de ayudar a la planta de Guinea Grass a tolerar las condiciones de sequía 15 días después de la siembra ya que se evidenció que la planta al ser tratada con las bacterias en cápsulas de hidrogel de acuerdo a las modalidades de esta invención tiene la capacidad de reducir los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) demostrada en la actividad enzimática de la ascorbato peroxidasa (APX) (Figura 15).

Ejemplo 7. Predicción de la vida útil con cinética de primer orden del consorcio de bacterias Grampositivas de *Bacillus subtilis* y *Priestia megaterium* de acuerdo con la formulación de las modalidades de esta invención, comparado con el mismo consorcio bacteriano sin la composición de la formulación.

Se evaluaron tres temperaturas: 24 °C ,50°C y 70°C y se cuantificó la viabilidad celular a los 15, 30, 45, 60 días como se describe anteriormente. Se utilizó la ecuación de Arrhenius para analizar la degradación bacteriana. Los resultados de la prueba de vida útil utilizando ecuaciones de primer orden permite deducir que la composición de la formulación propuesta en esta invención protege a las bacterias cuando están expuestas a un rango de temperatura amplio de 24 °C a 70 °C, hasta por 150 días, tal como se puede apreciar en la Tabla 6.

TABLA 6

Cinética de Reacción a 24°C

Prototipos evaluados.	Cinética de Primer orden		Vida útil:
	K a 24° C	R2	Días
Formulados en cápsulas de hidrogel de alginato - <i>Bacillus subtilis</i> .	-0,0030	0,8748	285
Sin Formulación - <i>Bacillus subtilis</i> .	-0,0039	0,5098	222
Formulados en cápsulas de hidrogel de alginato - <i>Priestia megaterium</i> .	-0,00300	0,7891	289
Sin Formulación - <i>Priestia megaterium</i> .	-0,00404	0,559	215

Cinética de Reacción a 50°C

Prototipos evaluados.	Cinética de Primer orden		Vida útil
	K a 50° C	R2	Días
Formulados en cápsulas de hidrogel de alginato - <i>Bacillus subtilis</i> .	0,0093	0,9598	93
Sin Formulación - <i>Bacillus subtilis</i> .	0,0154	0,9333	56
Formulados en cápsulas de hidrogel de alginato - <i>Priestia megaterium</i> .	-0,0041	0,9532	150
Sin Formulación - <i>Priestia megaterium</i> .	-0,0067	0,9814	70

5 Cinética de Reacción a 70°C

Prototipos evaluados.	Cinética de Primer orden		Vida útil
	K a 70° C	R2	Días
Formulados en cápsulas de hidrogel de alginato - <i>Bacillus subtilis</i> .	0,0215	0,9565	40
Sin Formulación - <i>Bacillus subtilis</i> .	0,0267	0,9836	33
Formulados en cápsulas de hidrogel de alginato - <i>Priestia megaterium</i> .	-0,0093	0,9897	45
Sin Formulación - <i>Priestia megaterium</i> .	-0,0116	0,9468	32

*K= Constante de perdida de viabilidad celular.

Vida útil: Tiempo de disminución de dos unidades logarítmicas