

7

Métodos de aplicación de biofertilizantes bacterianos

Luz Estela González de Bashan¹

Manuel Moreno Legorreta¹

Juan Pablo Hernández²

Prabu S.R.³

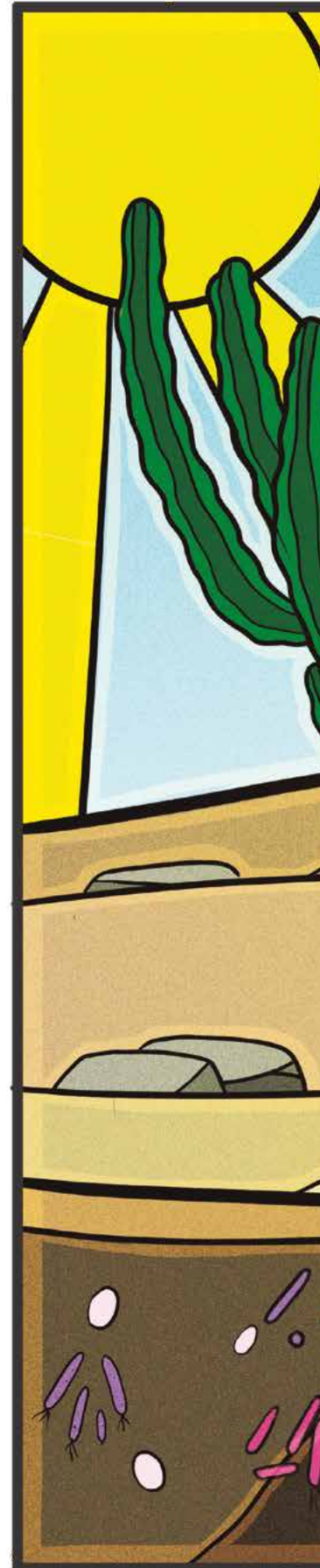
Jonathan Alberto Mendoza Labrador⁴

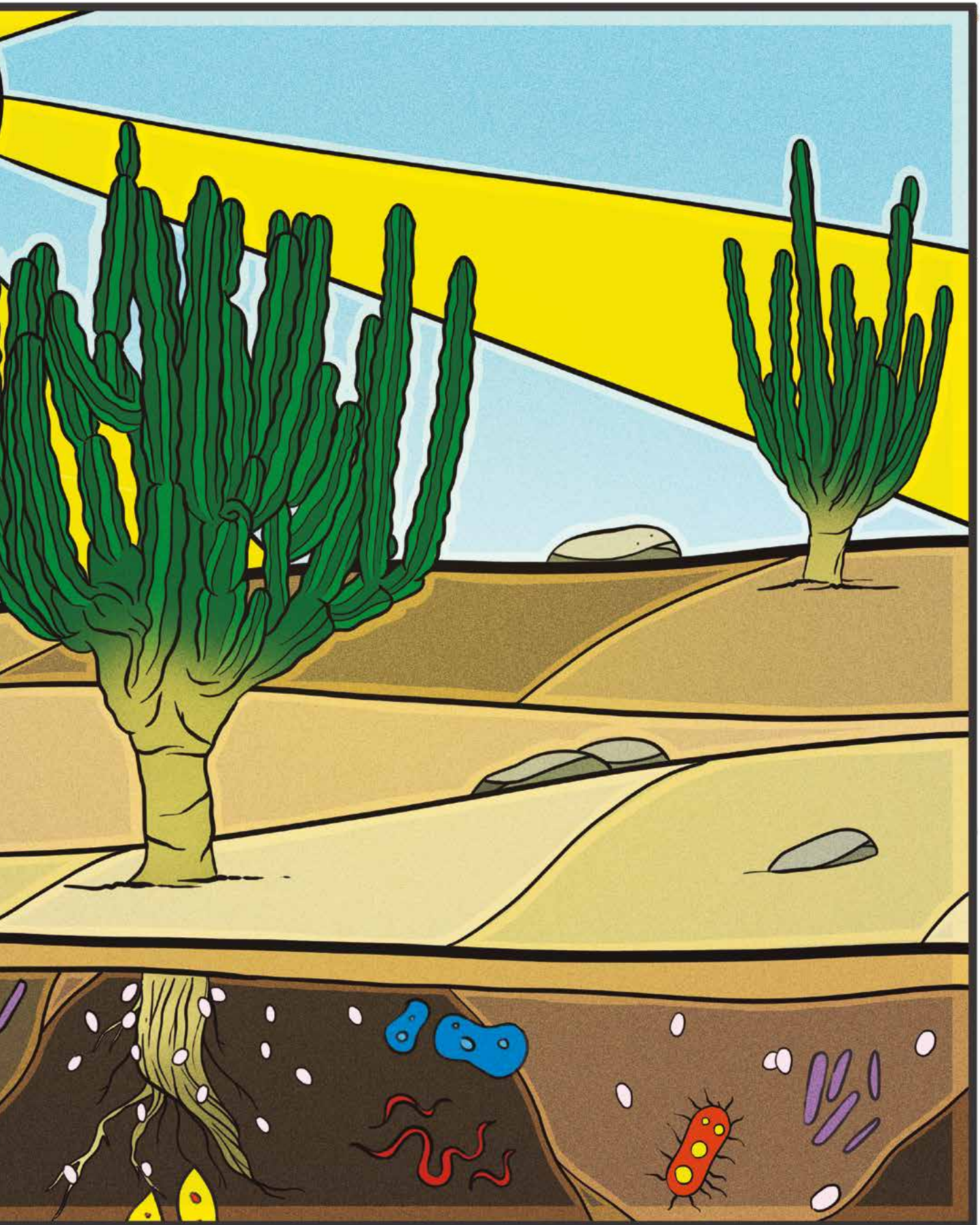
1. Grupo de Microbiología Ambiental, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, México.

2. Laboratorio de Investigaciones de Biología INBIBO. Universidad del Bosque. Bogotá. Colombia.

3. Servicio de Investigación Agrícola del Consejo Indio de Investigación Agrícola ICAR. India.

4. Sistemas Agropecuarios Sostenibles. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA. Centro de Investigación Tibaitatá. Cundinamarca. Colombia.





Introducción*

La inoculación de plantas con bacterias promotoras del crecimiento (PGPB, por sus siglas en inglés: plant growth promoting bacteria, o PGPR, plant growth promoting rhizobacteria), con el fin de mejorar el rendimiento de cultivos agrícolas, no es una práctica reciente.

El éxito de la inoculación depende tanto de la efectividad de las bacterias utilizadas como de la tecnología empleada para su aplicación. La razón del uso de inoculantes formulados es simple: con la inoculación de bacterias en suspensión aplicada directamente en el suelo, sin una formulación adecuada, la población de bacterias se ve rápidamente diezmada. Este resultado, combinado con una pobre producción de biomasa bacteriana, la dificultad para mantener la actividad bacteriana en la rizósfera y el estado fisiológico de las bacterias en el momento de la aplicación, puede afectar la concentración de PGPB en la rizósfera. Para obtener una respuesta positiva de la planta, es esencial contar con un número mínimo de células viables, el cual difiere según la especie.

La heterogeneidad característica de los suelos es el obstáculo más importante en la inoculación. En algunas ocasiones, las bacterias introducidas pueden encontrar todos los nichos de la rizósfera colonizados por otros microorganismos, por lo que las bacterias introducidas sin protección deben competir con la microflora nativa (a menudo mejor adaptada) y enfrentar la depredación por parte de la microfauna del suelo. Como respuesta, una función importante de cualquier formulación es proporcionar un microambiente más adecuado, así como protección física durante un tiempo prolongado. Las formulaciones empleadas en campo deben diseñarse para proporcionar una fuente confiable de bacterias que puedan sobrevivir en la rizósfera y estar disponibles para los cultivos cuando sea necesario (Bashan et al., 2014; Calvo et al., 2014; Herrmann & Lesueur, 2013).

Debido al uso poco claro en la literatura de los términos *inoculantes*, *biofertilizantes*, *bioplaguicidas*, *portadores* y *formulaciones*, en este capítulo los “aislados bacterianos” se refieren a una cepa bacteriana específica de PGPB/PGPR que puede promover el crecimiento de las plantas después de la inoculación; “portador” se refiere al sustrato abiótico (sólido, líquido o en gel) que se emplea en el proceso de formulación; “formulación” se refiere al proceso de laboratorio o industrial de unificar el portador con la cepa bacteriana, e “inoculante” se refiere al producto final de la formulación que contiene un portador y un agente bacteriano o consorcio de microorganismos.

* Este capítulo está dedicado a la memoria del Prof. Yoav Bashan, quien fue líder en el tema de inoculantes bacterianos, creador del Grupo de Microbiología Ambiental y fundador del Bashan Institute of Science.

Formulaciones de inoculantes

El rendimiento de un inoculante suele ser el talón de Aquiles para su comercialización. Una cepa bacteriana puede funcionar de manera óptima bajo condiciones de laboratorio controladas; sin embargo, la formulación de este microorganismo en un producto asequible para ser utilizado por los agricultores, del cual se esperan resultados similares en condiciones reales de campo, es una tarea difícil, y el fracaso es común (Bashan et al., 2014; Stephens & Rask, 2000). La literatura describe muchos inoculantes probados (Bashan, 1998; Bashan et al., 2014; Calvo et al., 2014), pero los inoculantes comerciales aparecen en muy pocas variaciones. Las siguientes son las formulaciones que se han desarrollado hasta el momento.

Medios de cultivo sin formulación adicional

El antiguo método de inoculación de semillas y plantas con cultivos bacterianos en suspensión aún prevalece. Es una práctica común entre los investigadores porque es el método menos laborioso y más descrito en la literatura.

Inoculantes líquidos

Los inoculantes líquidos son una mejora de los inoculantes “sin formulación”, ya que intentan solucionar algunas de las limitaciones enumeradas anteriormente. Básicamente, son simples cultivos o suspensiones bacterianas modificadas con sustancias que pueden mejorar la adherencia, la estabilidad y la capacidad de dispersión (Bashan et al., 2014; Singleton et al., 2002). La principal ventaja de los inoculantes líquidos es que su fabricación se puede realizar fácil y rápidamente en fermentadores, bajo condiciones controladas de laboratorio y con bajos costos de producción en comparación con otros tipos de formulaciones (granulares y poliméricas) (Kumaresan & Reetha, 2011). Por lo tanto, los inoculantes líquidos constituyen un porcentaje significativo de los inoculantes disponibles en el mercado (Lee et al., 2016).



Inoculantes con portadores orgánicos

Sin lugar a duda, la turba es el principal portador de rizobios en América del Norte y del Sur, Europa y Australia, además del principal ingrediente de los inoculantes que se venden en grandes volúmenes. También es adecuada para la mayoría de las otras PGPB o PGPR. Sin embargo, la materia prima es costosa en la mayor parte de Asia y África. Los detalles técnicos del inoculante a base de turba, como el tamaño del grano, el pH, la humedad óptima, la calidad de los inoculantes, los estándares de control de calidad y la salud y seguridad ocupacional, son de dominio público, por lo cual es ampliamente utilizado (Catroux et al., 2001; Deaker et al., 2004; Stephens & Rask, 2000; Xavier et al., 2004).

Las alternativas a la turba como base de los inoculantes han sido el lignito, el carbón, el polvo de bonote, compost de diversos orígenes y composiciones, residuos de caña de azúcar, bagazo, suelos mezclados con varias enmiendas orgánicas y vermiculita. Sin embargo, la mayoría de estos se consideran portadores inferiores a la turba (Bashan, 1998; Singleton et al., 2002). Algunos inoculantes orgánicos hechos de materiales de desecho se han probado con éxito en los últimos años, principalmente en países en desarrollo (Ben Rebah et al., 2007); ejemplos de estas formulaciones se describen en Bashan et al. (2014). Aunque algunos desechos orgánicos pueden tener el mismo o un mejor rendimiento que la turba, la principal limitación es la disponibilidad de suficiente materia prima para su uso industrial. El compost hecho de corcho, bagazo, aserrín, residuos de la cervecería u hojas de plátano puede sostener una pequeña industria de inoculantes local, donde los materiales están disponibles, pero no puede sostener producciones a nivel industrial, especialmente cuando la materia prima de cada lote es variable.

Inoculantes inorgánicos y parcialmente orgánicos

Los inoculantes inorgánicos pueden fabricarse a partir de materiales inorgánicos naturales, polímeros naturales o materiales sintéticos. Aparte de los poliméricos, los inoculantes inorgánicos son la versión más antigua de los inoculantes (véase Bashan, 1998), y algunos otros, como la arcilla y el biochar (carbón quemado a 300 °C),

se han usado experimentalmente para reforestación en zonas semiáridas como portadores potenciales de PGPB/PGPR (Hale et al., 2014; Schoebitz et al., 2014; Stelting et al., 2014). Si bien la mayoría de estos inoculantes se utilizan a pequeña escala para la producción de cultivos, todos los inoculantes poliméricos, hasta donde se sabe, son experimentales; sin embargo, debido a que abren un nuevo enfoque en la formulación, con infinitas variaciones industriales, se describen y discuten en detalle en este capítulo.

Inoculantes poliméricos

Las formulaciones sintéticas basadas en una gran variedad de polímeros se han probado de manera continua durante décadas porque ofrecen ventajas sustanciales sobre la turba y mejores opciones para la producción industrial. Estas ventajas incluyen una vida útil mucho más larga, una supervivencia adecuada en el campo, suficiente densidad celular, facilidad de fabricación y un mejor rendimiento de las plantas en general (Bashan, 1998; Bashan et al., 2014; John et al., 2011). Estos polímeros incluyen alginato, agar, kappa carragenina, pectina, quitosano, goma y varios polímeros patentados.

Todos estos polímeros comparten varios requisitos básicos: 1) son de naturaleza no tóxica y están libres de conservantes dañinos que puedan afectar tanto a las bacterias como a las plantas inoculadas; 2) pueden degradarse lentamente por microorganismos del suelo, con lo cual liberan gradualmente las bacterias en las cantidades necesarias, generalmente en el momento de la germinación de las semillas y la emergencia de las plántulas, sin crear contaminación secundaria; 3) proporcionan una protección física significativa para las bacterias contra competidores del suelo y estreses ambientales (Covarrubias et al., 2012; Cruz et al., 2013; Zohar-Perez et al., 2003); 4) retienen la humedad suficiente para la supervivencia de las bacterias, y 5) se pueden dispersar en agua para permitir el movimiento de las bacterias desde el polímero hasta las plantas, cuando sea necesario.

Otras características positivas de estos inoculantes poliméricos son: 1) brindan la posibilidad de que, una vez secos, puedan ser almacenados en condiciones ambientales favorables durante un tiempo prolongado y sin necesidad de refrigeración; 2) ofrecen la calidad de lote consistente para la fabricación y al mismo tiempo un



mejor ambiente para las bacterias; 3) dan la posibilidad de manipularlos industrialmente para satisfacer las necesidades específicas de las PGPB/PGPR, y 4) brindan la posibilidad de mejorarlos adicionando nutrientes para aumentar la supervivencia a corto plazo de las bacterias tras la inoculación, lo que incrementa el éxito del proceso. Esta última característica es esencial para las PGPB asociativas, que compiten en la rizósfera con microbios nativos.

El principal inconveniente de los inoculantes poliméricos es que las materias primas son relativamente costosas en comparación con la turba, el suelo y los inoculantes orgánicos, y requieren de un manejo industrial con costos similares a los de la industria de la fermentación, por lo que, hasta la fecha, no hay inoculantes poliméricos comerciales disponibles. Sin embargo, estos inoculantes pueden representar la tecnología del futuro. Un aspecto positivo de los inoculantes poliméricos es que siguen siendo del dominio de los laboratorios de investigación y no tienen protección patentada de empresas privadas, por lo cual hay más información disponible en la literatura científica.

Formulaciones encapsuladas

La encapsulación de microorganismos en polímeros (también conocida como *inmovilización*, cuando se usa un microorganismo, o *coimovilización*, cuando se usa más de un organismo) es actualmente experimental en los campos de la tecnología de inoculación de bacterias agrícolas y ambientales. Su uso industrial actual tiene como finalidad atrapar microorganismos vivos en una matriz polimérica mientras se mantiene su viabilidad y funciones biológicas. Posteriormente, el producto final encapsulado (bacteria-polímero) se fermenta en un medio de crecimiento bacteriano, con el fin de obtener productos industriales tales como ácidos orgánicos, aminoácidos, enzimas y vitaminas. Los productos bacterianos deseados se extraen mientras continúa la fermentación. Las células microbianas inmovilizadas son fáciles de producir, almacenar y manipular durante la producción industrial. El objetivo principal de las inmovilizaciones industriales es mantener las células inmovilizadas en

una forma activa, en altas concentraciones, durante el mayor tiempo posible. Las formulaciones de PGPB/PGPR inmovilizadas para aplicaciones agrícolas tienen al menos dos propósitos muy distintos de los de la industria de la fermentación: 1) deben proporcionar protección física temporal para las PGPB/PGPR inmovilizadas en el suelo contra condiciones ambientales estresantes y contra competidores microbianos y depredadores, todos hostiles ante cualquier cambio en la composición biológica del suelo, y, 2) para una colonización de raíces exitosa, deben liberar la cepa PGPB/PGPR gradualmente. La liberación de las bacterias inmovilizadas se produce cuando el polímero se degrada lentamente por los microorganismos nativos del suelo.

Macroesferas de alginato

El uso de macroesferas de alginato (1-4 mm de diámetro) para inmovilizar diversas PGPB/PGPR y hongos micorrízicos es una tecnología ampliamente utilizada. Por ejemplo, *Streptomyces* sp. fue inmovilizado en esferas de alginato-caolina (aluminosilicato), inicialmente mezclando la bacteria con caolina y agregando esta mezcla, después, al alginato, para así formar las esferas; finalmente, las esferas fueron secadas y congeladas. Esta formulación se presentó como un polvo fácil de hidratar al adicionar almidón, talco y más caolina, con el fin de alargar la vida útil del inoculante por más de 14 semanas. Esta formulación permitió producir diversas variaciones en la eficiencia para el control biológico del hongo patógeno del tomate *Rhizoctonia solani* (Sabaratnam & Traquair, 2002).

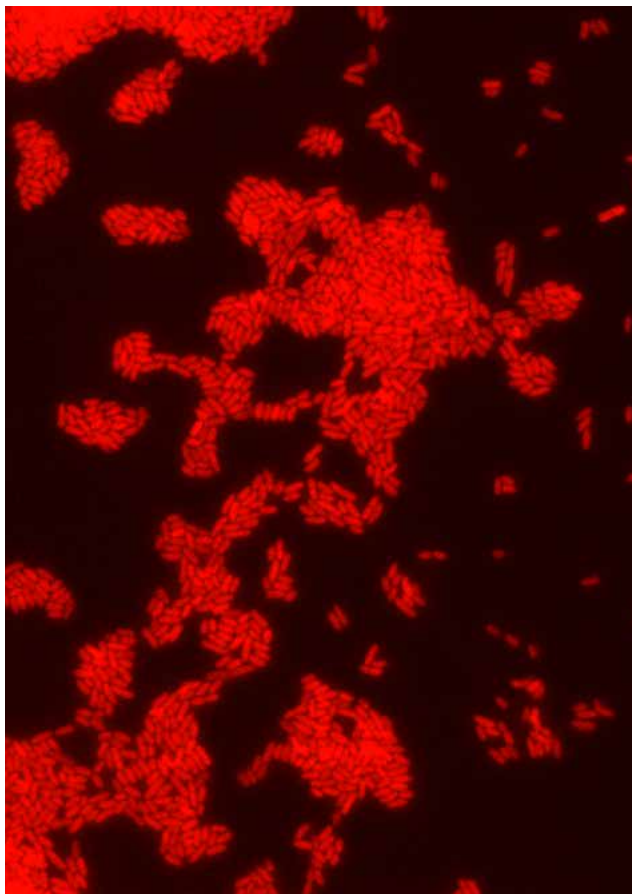
La encapsulación de la PGPB/PGPR *Bacillus subtilis* en esferas de alginato suplementadas con ácidos húmicos permitió aumentar la viabilidad de las bacterias inmovilizadas, con una excelente supervivencia cinco meses después de su almacenamiento. Por otro lado, se presentó una liberación lenta de las bacterias, en medios con diferentes pH, durante un mes, y se comprobó la promoción del crecimiento de lechuga con el uso de estos encapsulados bacterianos (Young et al., 2006). El éxito de esta técnica particular de inmovilización se debe al efecto positivo que tienen los ácidos húmicos sobre microorganismos y plantas, así como a sus propiedades químicas, entre las que se encuentra la facilidad de ser mezclados con el alginato sin que este modifique la formación de las esferas. Uno

de los beneficios que presentan los ácidos húmicos, mezclados con las esferas de alginato, es que sirven como una fuente de carbono para *Pseudomonas putida* y *B. subtilis*, con lo que se promueve la sobrevivencia de los microorganismos durante el tiempo de almacenamiento (Rekha et al., 2007). La bacteria solubilizadora de fosfato *Serratia* sp. inmovilizada demostró ser mucho más eficiente que la misma bacteria sin inmovilizar, pues aumentó el crecimiento de plantas de trigo (Schoebitz et al., 2013). La eficiencia de la PGPR *Raoultella planticola*, inmovilizada y en suspensión, para promover el crecimiento de plantas de algodón bajo estrés salino, mostró que el encapsulado de esta bacteria tiene potencialmente un mayor efecto positivo en comparación con el inoculante en suspensión (Wu et al., 2014).

La inmovilización en esferas de alginato puede extender el tiempo de vida efectiva de las bacterias. Esto se comprobó cuando las PGPB *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*, inmovilizadas en dos tipos de inoculantes de perlas de alginato, lograron ser recuperadas después de que los inoculantes fueron secados y almacenados a temperatura ambiente durante 14 años. Aunque las poblaciones en las perlas habían disminuido, aún sobrevivieron números significativos (10^5 - 10^6 UFC g⁻¹ perlas). Después de inocular plantas de trigo en una cámara de crecimiento, ambas especies colonizaron y aumentaron el crecimiento en igual medida que las que no se habían almacenado (Bashan & Gonzalez, 1999). Vassilev et al. (2001) demostraron que la inoculación de plantas de tomate con el hongo micorrízico arbuscular *Glomus deserticola* y la levadura solubilizadora de fosfato *Yarrowia lipolytica*, coinmovilizados en esferas de alginato, es una técnica muy útil para el establecimiento de plantas en suelos con deficiencia de nutrientes. El cultivo de hongos blancos (*Agaricus bisporus*) mejoró con el inoculante de alginato en suspensión aplicado como soporte, lo que proporcionó un periodo de adaptación (*lag*) más corto y una mayor tasa de crecimiento en compost pasteurizado, en comparación con los soportes líquidos y los soportes convencionales de grano comerciales. La superioridad de este sistema de entrega se atribuye a la alta capacidad de carga de biomasa de las esferas, la protección de los micelios en el microambiente e incluso la distribución espacial de las esferas en el compost (Friel & McLoughlin, 1999).

Las esferas de alginato también pueden proporcionar protección contra las altas temperaturas. La formulación de alginato permitió mantener altas poblaciones y supervivencia de las bacterias solubilizadoras de fosfato *Pseudomonas striata* y *Bacillus polymyxa* en temperaturas de almacenamiento de 40 °C (Viveganandan & Jauhri, 2000). Asimismo, varias formulaciones de macroesferas de alginato de *B. subtilis* y *Pseudomonas corrugata* mostraron ser más eficientes que los inoculantes líquidos o los inoculantes a base de carbón para mejorar el crecimiento del maíz cultivado a bajas temperaturas en el Himalaya, en India (Trivedi et al., 2005). Igualmente, la supervivencia de las rizobacterias *Raoultella terrigena* y *A. brasilense* durante la encapsulación se mejoró incorporando almidón en el momento de realizar la preparación de las esferas de alginato, así como adicionando trehalosa, un disacárido, en el medio de cultivo (Schoebitz et al., 2012).

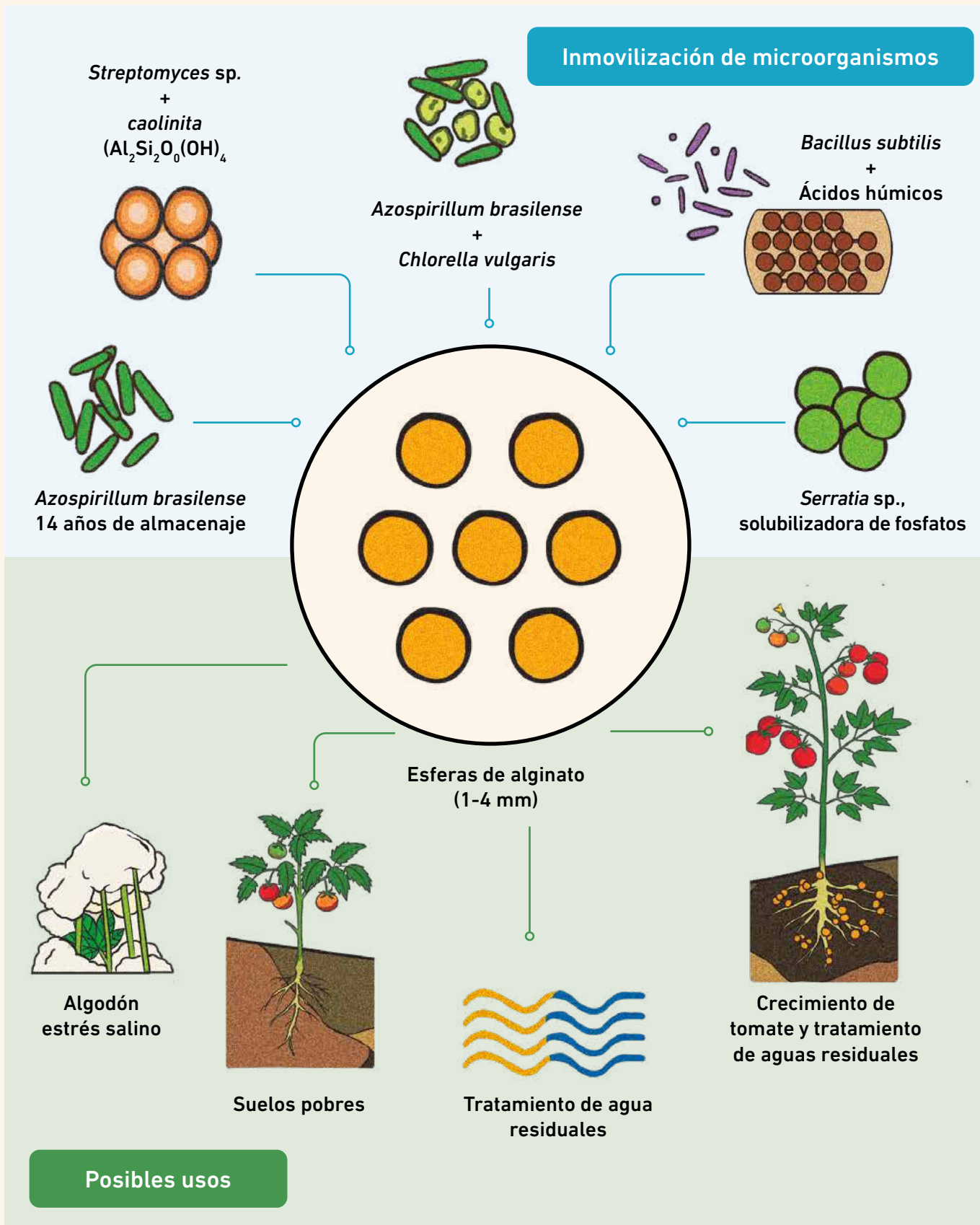
Otra aplicación de los inoculantes de macroesferas de alginato es en el tratamiento de aguas residuales terciarias usando microalgas (de-Bashan & Bashan, 2010; de-Bashan et al., 2015). Para este fin, se puede usar una combinación de microalgas (*Chlorella vulgaris* o *Chlorella sorokiniana*) y una PGPB como *A. brasilense*, las cuales pueden ser coinmovilizadas. Este sistema único elimina los nutrientes, como el fósforo y el nitrógeno, de las aguas residuales municipales. La coinmovilización de la microalga y la bacteria ha mostrado consistentemente valores más altos de remoción de nutrientes en comparación con la inmovilización de la microalga sola (Covarrubias et al., 2012; Cruz et al., 2013; de-Bashan et al., 2002; de-Bashan et al., 2004; Hernandez et al., 2006). Asimismo, la coinmovilización de la cianobacteria *Synechococcus elongatus* con la bacteria *A. brasilense* resultó en una mayor eliminación de fósforo de las aguas residuales de acuicultura en comparación con la cianobacteria que se encontraba inmovilizada sola (Ruiz-Güereca & Sánchez-Saavedra, 2016). Después de tratar las aguas residuales, las esferas con *C. sorokiniana* y *A. brasilense* se secaron y almacenaron por un año, y posteriormente fueron usadas para incrementar el crecimiento del sorgo y mejorar la fertilidad del suelo desértico erosionado (Lopez et al., 2013; Trejo et al., 2012). De manera similar, Escalante et al. (2015) observaron que la coinmovilización de *A. brasilense* y *C. vulgaris* mejoró el crecimiento de plantas de tomate en condiciones salinas.

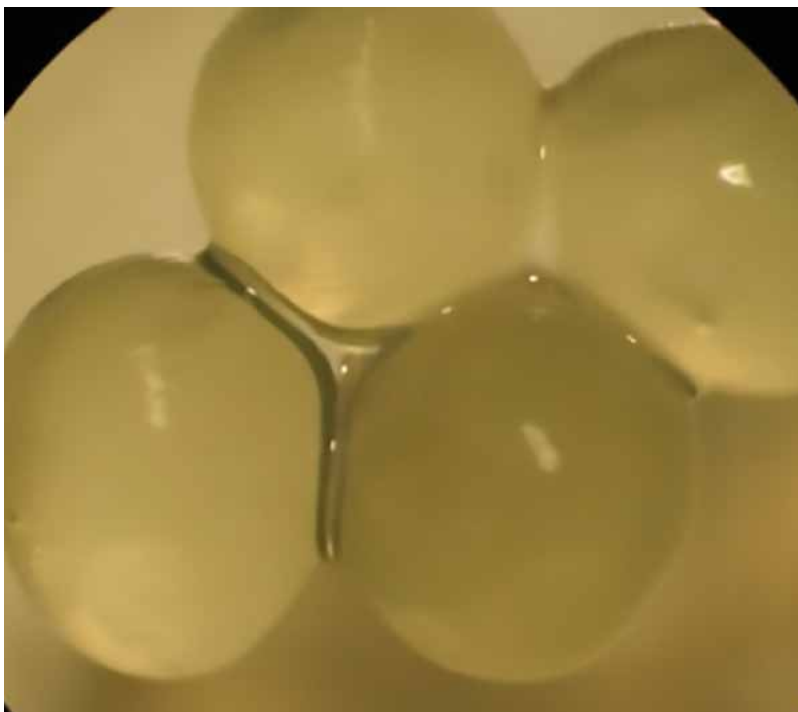


Si bien la formulación de alginato puede haber resuelto las dificultades asociadas con los inoculantes de turba comunes (Bashan, 1998), la aplicación de macroesferas de alginato como inoculantes presenta dos desventajas principales: 1) se necesita un tratamiento adicional durante la siembra, incluso si el inoculante es adicionado a una máquina sembradora; 2) las bacterias liberadas del inoculante deben migrar a través del suelo hacia las plantas. Bajo las prácticas agrícolas típicas, cuando las esferas se mezclan con las semillas y se siembran juntas, aquellas pueden caer alejadas de las semillas unos pocos centímetros, y las bacterias que se liberan de las esferas deben moverse a través del suelo y enfrentar, allí, la competencia y la depredación con la microflora nativa, que a menudo es más agresiva y está mejor adaptada al suelo que la PGPB/PGPR agregada. A veces, la ausencia de una película continua de agua, esencial para tal movimiento, es un factor limitante. Estas distancias, que son grandes a escala microbiana, pueden resultar difíciles para muchas PGPB/PGPR agregadas, incluso para *Azospirillum*, que se ha comprobado que presenta una alta movilidad en el suelo (figura 7.1) (Bashan & Holguin, 1994; Bashan & Levany, 1987).

■ **Figura 7.1.** Inmovilización de dos microorganismos en el suelo.

Fuente: Elaboración propia





Microesferas de alginato

Las microesferas de alginato (50-200 μm de diámetro, aproximadamente) fueron desarrolladas para superar las dos dificultades fundamentales de las macroesferas.

El mecanismo considera que, si las esferas son lo suficientemente pequeñas, pero capaces de encapsular un número suficiente de bacterias, es posible producir una formulación “en polvo” muy parecida a los inoculantes de turba. Las semillas se pueden recubrir con el polvo de esferas en la planta de manejo de semillas y ser vendidas a los agricultores como “semillas mejoradas”. Las semillas recubiertas con fertilizantes, fungicidas u hormonas son comunes y aceptadas por la mayoría de los agricultores. En países desarrollados, con prácticas agrícolas a gran escala, las semillas prerrecubiertas eliminan un tratamiento de campo adicional y brindan comodidad a los agricultores. A pesar de este beneficio significativo, el prerrecubrimiento de semillas con PGPB/PGPR no es una tarea fácil a nivel industrial, si consideramos los problemas antes mencionados. Algunos de los compuestos usados para realizar el recubrimiento pueden ser tóxicos o no son compatibles con las PGPB/PGPR, por lo que hasta ahora solo se han realizado experimentos a pequeña escala. Sin embargo, una idea de formulación similar, pero con un inoculante de turba, se ha aplicado comercialmente durante mucho tiempo como una preinoculación de leguminosas forrajeras, como la alfalfa. La turba que contiene la PGPB/PGPR se aplica a las semillas como suspensión, y después se agrega un adhesivo para que las semillas inoculadas se cubran con carbonato de calcio finamente molido (Brockwell, 1977).

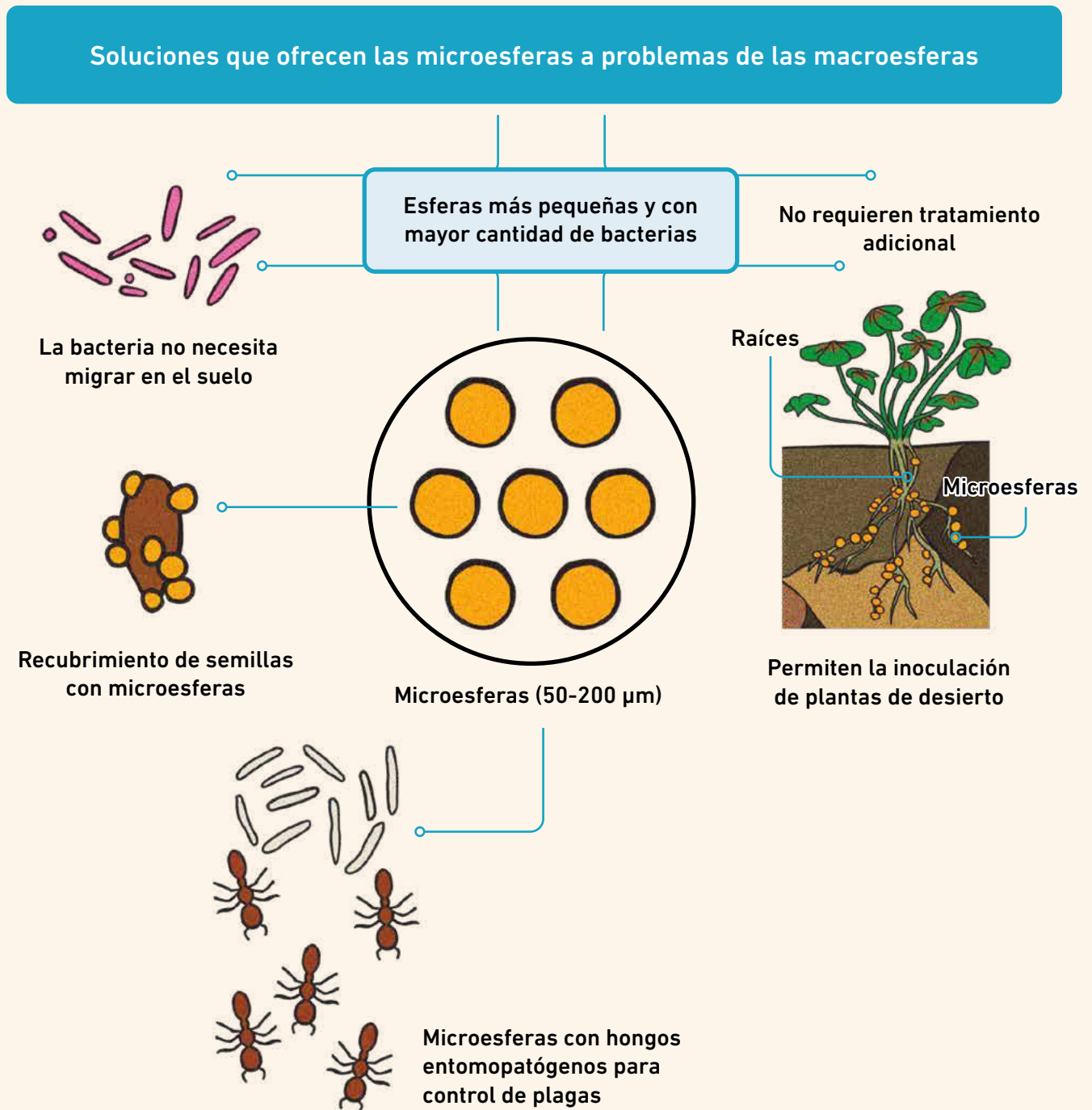
La producción de microesferas de alginato es relativamente simple e implica la pulverización a baja presión a través de una boquilla con orificios muy pequeños, lo que da como resultado gotas con un diámetro en micras de una solución de alginato, en la cual se encuentra mezclado un cultivo bacteriano

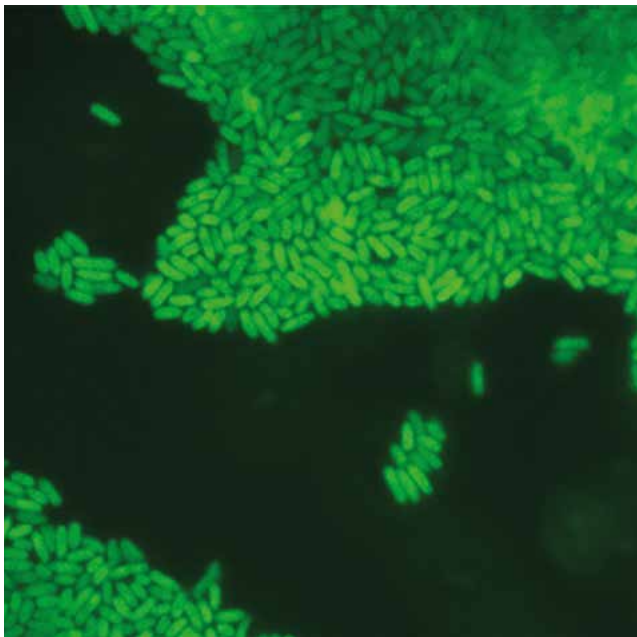
suspendido y un medio líquido enriquecido. Estas gotas se solidifican inmediatamente, formando las microesferas, mientras que se van pulverizando en una solución de CaCl_2 ; este sistema crea esferas con diámetros que oscilan entre 100 y 200 μm y en las que se pueden llegar a inmovilizar entre 10^8 y 10^{10} UFC g^{-1} de bacterias (Bashan et al., 2002), cifra similar a los niveles de población inmovilizados en las macroesferas de alginato (Campos et al., 2014).

Existen equipos especializados para la producción de estas microesferas de alginato (Bashan et al., 2002), pero una alternativa simple, que permite su producción sin la necesidad de estos equipos, es moler láminas sólidas y secas de alginato, para producir el polvo que contenga las PGPB/PGPR, y posteriormente usar algún tipo de adhesivo agrícola que permita el recubrimiento de las semillas (figura 7.2).

■ **Figura 7.2.** Soluciones que ofrecen las microesferas a problemas de las macroesferas.

Fuente: Elaboración propia





Futuras mejoras de las microesferas de alginato

Actualmente, la inmovilización de microorganismos se ha empleado en campos de investigación más amplios, como la alimentación, la farmacología, la nanotecnología y los cosméticos. En consecuencia, en el sector agrícola se han propuesto varias mejoras técnicas derivadas de estos campos, con el objetivo de hacer que el polímero sea más adecuado para la inmovilización de materiales biológicos. Aunque estas técnicas no están relacionadas con los inoculantes agrícolas, ofrecen perspectivas para desarrollos futuros (John et al., 2011; Schoebitz et al., 2013). Algunos ejemplos que tienen potencial para la producción de inoculantes son: 1) crear un complejo *avidin*-biotina. La biotina, acoplada covalentemente con el alginato en una reacción de fase acuosa, combina las ventajas del gelificante de alginato para proporcionar un ambiente suave, hidratado y altamente poroso (Polyak et al., 2004). 2) Reforzar la superficie de los hidrogeles de alginato con varios polímeros secundarios, para mejorar la resistencia mecánica y la estabilidad, con el fin de retrasar su degradación en el suelo (Nussinovitch, 2010); algunos ejemplos de aditivos que refuerzan los geles son la polietilenimina (Kong & Mooney, 2003), el ácido poliacrílico (Gaumann et al., 2000) y el quitosano (Wang et al., 2001). 3) Formar esferas con una estructura de poro interconectada en alginato, para mejorar el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos, mediante la incorporación de bolsas de gas dentro de las esferas (Eiselt et al., 2000).

En resumen, según experimentos de las últimas tres décadas, el alginato es el polímero más prometedor. Sin embargo, dada la escasa bibliografía disponible sobre microesferas de alginato ligadas a proyectos agrícolas, es prematuro predecir si el alginato desplazará a la turba como el principal inoculante agrícola, si permanecerá en el área de la microbiología industrial y ambiental o, incluso, si el material es económico en comparación con otros polímeros.

Inoculantes poliméricos con otros materiales

Irónicamente, aunque los preparados comerciales de alginato aún no están disponibles para PGPB/PGPR, varios otros polímeros que se utilizan en microbiología industrial y ambiental pueden considerarse como sustitutos cuando los microorganismos fallan al adaptarse a preparaciones de alginato. A pesar de que todos los materiales son todavía experimentales, vale la pena mencionarlos para fomentar más investigación sobre estos portadores potenciales. Los casos anteriores se enumeran en Bashan (1998) y Bashan et al. (2014).

La formulación con quitosano como portador para varias PGPR se mezcló con un medio de crecimiento mineral como un control biológico exitoso contra el virus del mosaico del pepino en el tomate (Murphy et al., 2003). Se prepararon cinco PGPB en varias formulaciones de polímeros compuestos de almidón carboximetilcelulosa, y estas mantuvieron las cepas bacterianas en grandes cantidades durante 60-120 días de almacenamiento, además de que fueron eficaces para promover el crecimiento de cortes de caña de azúcar (Da Silva et al., 2012). La PGPB *P. fluorescens* fue formulada con tres polímeros: copolímero de ácido metacrílico (película comercial), etilcelulosa y un almidón modificado. La mejor formulación fue el polímero comercial, pues las bacterias sobrevivieron por un año, efecto que se relacionó con la humedad residual de las microesferas (la mayor supervivencia de las bacterias se produjo cuando la humedad residual fue del ~25 %); sin embargo, este inoculante no se probó en plantas (Amiet-Charpentier et al., 1998). Aun con estos resultados, con información tan limitada sobre estos portadores, es imposible predecir su futuro como inoculantes bacterianos.



Portadores poliméricos secos

El objetivo principal de inmovilizar PGPB/PGPR para usos agrícolas es aumentar la vida útil, en lugar de mantener un alto conteo bacteriano, ya que el número de microorganismos disminuye durante el almacenamiento. Desde el punto de vista comercial y agrícola, una mayor supervivencia de las bacterias en estas preparaciones poliméricas hace que las formulaciones secas sean extremadamente atractivas.

Varios estudios han probado inoculantes de alginato seco. Una formulación de microesferas con *A. brasilense* seco se adhirió fácilmente a la superficie de las semillas al añadir lecitina o un adhesivo sintético. Los inoculantes secos mejoraron el desarrollo de plántulas de trigo y tomate (peso seco y altura de las plantas) cultivadas en suelo infértil y fueron biodegradados en 15 días en suelo húmedo (Bashan et al., 2002). Igualmente, una formulación de microesferas similar fue utilizada para la reforestación de un desierto con árboles leguminosos (Bashan, Salazar, & Puente, 2009; Bashan, Salazar, Puente, et al., 2009; Bashan et al.,

2012). La eficacia de las esferas de alginato liofilizado se probó con una cepa agrícola de *Pantoea agglomerans*. Las esferas secas fueron complementadas con glicerol y quitina, con el fin de mejorar la supervivencia bacteriana durante el proceso de liofilización. Estas perlas fueron capaces de proteger mejor la PGPB/PGPR aplicada al suelo que la suspensión bacteriana (Zohar-Perez et al., 2002). El recubrimiento de semillas secas con varias formulaciones de alginato, ya sea solo o con aditivos de salvado y de quitina, pero sin PGPB, no afectó la viabilidad o el porcentaje de germinación de las semillas de trigo, albahaca, col y rábano (Sarrocchio et al., 2004); sin embargo, el alginato de sodio, suministrado como aditivo a la formulación líquida sin polimerización, aumentó significativamente la vida útil de *Sinorhizobium meliloti* (Tarek et al., 2014). Además, esferas secas hechas con una mezcla de alginato y bentonita fueron muy eficientes en la liberación lenta de la PGPR *Raoultella planticola*, pero esta formulación no fue probada en las plantas. Otra combinación de alginato con proteína de guisante demostró proteger a la bacteria *B. subtilis* en el suelo (Gagné-Bourque et al., 2015).

Vida útil de los inoculantes

Mantener la vida útil de los inoculantes durante un determinado tiempo, conservando sus características biológicas intactas, es un desafío importante para cualquier tipo de formulación.

Por ahora, las soluciones más comunes a este problema han sido 1) reducir la humedad en la formulación, para que permanezca seca (secándola en un lecho fluidizado, secando al aire o liofilizando), o 2) almacenarla bajo refrigeración. En formulaciones completamente secas, las bacterias permanecen en forma latente, y su metabolismo es muy lento o, incluso, está detenido; de esta forma, son resistentes al estrés ambiental, son más compatibles con las aplicaciones de fertilizantes en campo y se reduce la posibilidad de contaminación.

La principal dificultad con las formulaciones poliméricas secas es mantener la viabilidad celular o la vida útil de los microorganismos, debido a tres factores que deben soportar: estrés por la inmovilización, estrés por la desecación y estrés por la rehidratación antes de la aplicación a las raíces de las plantas. Además, durante el estrés y el tiempo de almacenamiento, la tasa de mortalidad alcanza más del 90 % de la población microbiana incorporada en el punto de inicio, como resultado del proceso de fermentación. Asimismo, la fase más crítica y estresante para los microorganismos durante el proceso de formulación es, quizás, la deshidratación. Este proceso es particularmente difícil para las bacterias Gram-negativas que no forman esporas, que son la mayoría de las especies de PGPB/PGPR. Inclusive, un estrés adicional por hidratación en las células se produce cuando las bacterias se reactivan en el momento de la inoculación. Igualmente, la vida útil de los inoculantes formulados se puede afectar por diversos factores, como el medio de cultivo utilizado para la producción de biomasa de PGPB/PGPR, el estado fisiológico de las bacterias cuando se extraen del medio, el proceso de inmovilización celular, el uso de materiales de protección, el tipo de procedimiento de secado y la velocidad de deshidratación. El secado durante la formulación es un paso crucial. La mayor tasa de mortalidad se produce poco después de la fabricación, durante el almacenamiento o inmediatamente después de la aplicación a las semillas o al suelo (Date, 2001). Sin embargo, si se deshidrata correctamente, la vida útil de la formulación seca es mucho más larga que la de cualquier inoculante húmedo.

Una comparación entre varias formulaciones orgánicas, inorgánicas y poliméricas con dos PGPB demostró que *B. subtilis* sobrevivió a una temperatura ambiente de 22 °C durante 45 días, pero *Pseudomonas putida* requirió refrigeración a 0 °C, dependiendo del tipo de soporte utilizado (Amer & Utkhede, 2000). Rizobios almacenados a 25 °C, utilizando como soportes el compost de corcho irradiado con rayos gama (γ) y perlita estéril, permanecieron estables durante un periodo de 90 a 120 días. Igualmente, los inoculantes compuestos de dos arcillas preservaron una alta población bacteriana durante más de 5 meses (Albareda et al., 2008), lo que también es típico de los inoculantes poliméricos, que son esencialmente estériles.

La literatura comercial que se encuentra en internet muestra que la vida útil deseable en condiciones de almacenamiento para inoculantes de turba es de uno a dos años, aunque en la práctica esto no es cierto para muchos de los inoculantes de PGPB/PGPR contemporáneos. Al respecto, la vida útil es más larga para inoculantes poliméricos y sintéticos. Trejo et al. (2012) reportaron que el inoculante de esferas secas de alginato que contienen *A. brasilense* fue almacenado a temperatura ambiente durante un año y mantuvo el efecto de promoción del crecimiento vegetal de *A. brasilense* inmovilizado cuando fue inoculado en plantas de sorgo, con diferencias significativas; posteriormente, las poblaciones de *A. brasilense* dentro de las perlas secas disminuyeron con el tiempo. Del mismo modo, se encontraron datos idénticos en un inoculante de alginato-almidón: el 76% de las células viables de *A. brasilense* sobrevivieron a más de un año de almacenamiento (Schoebitz et al., 2012). Asimismo, se mostró un tiempo de supervivencia de tres años, sin perder la viabilidad, de las bacterias *B. subtilis* y *Pseudomonas corrugata* inmovilizadas en esferas húmedas de alginato a una temperatura de 4 °C (Trivedi

& Pandey, 2008). Por último, el tiempo de supervivencia más largo, sin perder eficacia, fue de 14 años, para las cepas *A. brasilense* y *P. fluorescens* inmovilizadas en esferas de alginato secas (Bashan & Gonzalez, 1999).

En resumen, el éxito de una formulación en inoculantes se refleja en poder garantizar una viabilidad celular durante un periodo de tiempo aceptable, para poder asegurar una inoculación exitosa en las raíces de las plantas y en las semillas. Actualmente, para mantener una buena estabilidad celular en inoculantes, se están utilizando aditivos que pueden mantener el crecimiento de las bacterias y, de esta manera, ayudar a prolongar la vida útil del inoculante en almacenamiento. Entre los aditivos más utilizados, se encuentran 1) polímeros naturales, como carragenina, goma arábica, goma xantana, gelatina, alginato, entre otros, y 2) polímeros sintéticos, como alcohol polivinílico y polivinilpirrolidona (PVP), aceite hortícola, glicerol y monodisacáridos (como la glucosa y la lactosa) (Lobo et al., 2019). Sin embargo, Bashan et al. (2014) reportaron mejores resultados de prolongación de la vida útil de los inoculantes cuando se emplearon formulaciones poliméricas secas.



Productos emergentes innovadores: productos microbianos sin células

Las limitaciones inherentes de los inoculantes basados en células vivas siguen siendo un fuerte cuello de botella en la aplicación generalizada de bioproductos y continúan retrasando la comercialización y el uso de PGPB/PGPR en una escala mayor. Evidentemente, existe un creciente interés en producir y comercializar bioproductos que no se vean afectados por las condiciones del suelo y el clima y que sean capaces de lograr un rendimiento constante. Actualmente están surgiendo “inoculantes” hechos de fragmentos activos y metabolitos de PGPB/PGPR en ausencia de células vivas. Además, en la última década se han documentado la utilización de inductores para activar el mecanismo de defensa de las plantas y la producción de metabolitos secundarios producidos a partir de PGPB/PGPR. Estos productos microbianos se producen comercialmente y tienen potencial como “inoculantes” para reducir el uso de agroquímicos (Compant et al., 2013). Asimismo, existe una tendencia creciente en el número de productos microbianos comerciales sin células, basados únicamente en metabolitos secundarios, que pueden integrarse con las prácticas culturales de los agricultores y generalmente no se ven afectados por las condiciones del suelo o del clima.

Veselova et al. (2019) mostraron que *Bacillus subtilis* Cohn (cepa 26 D) y *Bacillus thuringiensis* Berliner (cepas V-6066 y V-5689) son capaces de suprimir la actividad viral del pulgón (*Schizaphis graminum* Rond.) en plantas de trigo, posiblemente debido a metabolitos secundarios producidos que activan rutas metabólicas (aún no muy claras) que ayudan a la inducción de resistencia sistémica en las plantas frente a un patógeno. Además, se conoce que los rizobios secretan lipoquitooligosacáridos (LCO), los cuales son factores de nodulación que inducen la formación de nódulos en raíces de leguminosas (Truchet et al., 1991). Aunque, los LCO son moléculas de señalización importantes en la interacción planta-simbionte, estos pueden afectar directamente el crecimiento y desarrollo de las plantas no leguminosas (Prithiviraj et al., 2003; Tanaka et al., 2015). Productos comerciales a base de LCO para aplicaciones foliares y en semillas de leguminosas y no leguminosas se encuentran disponibles en Norteamérica. Del mismo modo, hormonas producidas, exopolisacáridos (EPS) y LCO producidos a partir de rizobios tienen una vida útil de 24 meses. Este producto mejoró los rendimientos de soya y maíz, y está registrado para su uso en Brasil (Marks et al., 2013). Además, se sabe que los LCO mejoran la simbiosis de las plantas con hongos micorrízicos arbusculares (Xie et al., 1995).

Por todo esto, se esperan usos más prácticos de este metabolito secundario en los próximos años.

Perspectivas hacia el futuro

Aunque la opinión predominante en muchas compañías que producen PGPB/PGPR es que la formulación es una cuestión secundaria y rápida de desarrollar una vez que se selecciona la PGPB/PGPR correctamente, el desarrollo de nuevas formulaciones para la inoculación de estas bacterias y rizobios es un proceso muy lento y consume recursos. La creación de nuevas formulaciones es un desafío en la microbiología práctica, y los atajos generalmente conducen al fracaso del inoculante en el campo. Así, las mejoras en las formulaciones son clave para el desarrollo de inoculantes mejorados de alta calidad.

Los siguientes temas deben ser las principales prioridades de la investigación sobre sistemas de administración nuevos o mejorados para PGPB/PGPR y rizobios, excluyendo las formulaciones de turba, que ya han alcanzado su punto máximo:

- Evaluación más precisa de portadores conocidos. Periódicamente, una nueva formulación, que involucra un portador conocido, como alginato o inoculante líquido, que contiene un suplemento, se presenta como una solución para todas las enfermedades de los portadores anteriores.
- Mejora de las formulaciones que mostraron resultados positivos en campo, lo que requiere un ajuste fino de los ingredientes clave (cantidades, condiciones y proporción de mezclas) o mejoras en el proceso de producción. Aunque se supone que la evaluación es realizada por la industria, no se dispone de información específica.
- Mejora de la supervivencia de la PGPB/PGPR en el inoculante. La reducción del declive de la población de la PGPB/PGPR durante la formulación y la aplicación debe ser un objetivo importante de la investigación. Si la mortalidad celular se reduce significativamente, puede ser posible aumentar el número de células aplicadas por semilla en dos o tres órdenes de magnitud. Esto incluye la edad fisiológica de las células (fase de crecimiento) y la
- humedad relativa durante el almacenamiento, que depende de la especie. El proceso de deshidratación y la optimización de la tasa de rehidratación deben ser, igualmente, un objetivo de investigación.
- Vida útil de la formulación. Esta es una preocupación comercial esencial porque el tiempo de aplicación en campo es corto, mientras que el tiempo de producción de grandes cantidades en la fábrica es largo, y por lo general este proceso no se puede hacer poco antes de la aplicación. Mantener la eficacia de la formulación durante dos años sería óptimo.
- Inoculantes de múltiples cepas y combinación de inoculantes que contienen rizobios y una PGPB/PGPR. Numerosos estudios han demostrado las ventajas de estas combinaciones, generalmente demostradas solo en laboratorio, sin ninguna formulación. Si bien la formulación de varios microorganismos no agrega dificultades técnicas significativas en comparación con la formulación de un microorganismo, la interacción de los componentes dentro de estas formulaciones es en gran parte desconocida. El desarrollo de estos consorcios de inoculantes requiere exploraciones con respecto a 1) compatibilidad entre poblaciones microbianas, 2) simbiosis o interacción con las plantas, 3) eficiencia de los aspectos que promueven el crecimiento de las plantas, 4) tasa de crecimiento de estas cuando están juntas, 5) potencial de formación de biopelículas y 6) dificultades técnicas en el cultivo de microorganismos en un fermentador, donde cada uno tiene diferentes requerimientos nutricionales u otras condiciones de cultivo *in vitro*.
- Aditivos para muchas formulaciones. Si bien estos ya son un hecho, los estudios de aditivos utilizados en las formulaciones se han realizado de forma *ad hoc* y son en gran medida empíricos. Además, rara vez se entiende su modo de acción. Esta parte del proceso de formulación es un campo virgen y merece más atención.
- Inoculantes poliméricos. Aunque muchos estudios han señalado que este es el futuro de los inoculantes, ninguna de estas formulaciones para PGPB/PGPR o rizobios ha superado el umbral de aprobación industrial. La inmovilización de microorganismos

es un gran campo emergente en farmacéutica, nanotecnología, medicina, acuicultura y cosmética, para lo cual se han desarrollado muchas técnicas de inmovilización diferentes y eficientes (Bioencapsulation, 2020; Schoebitz et al., 2013).

- Esfuerzo necesario para el agricultor. Es difícil que las prácticas agrícolas comerciales cambien significativamente, incluso para adaptarse a una tecnología que ofrezca un inoculante de alta calidad. En consecuencia, el objetivo debe ser crear formulaciones que sean más amigables con el agricultor, como lo son algunos de los inoculantes contemporáneos. El mejor enfoque será el de aquellas formulaciones que no impliquen un esfuerzo adicional por parte del agricultor.
- Cepas locales. Las cepas locales deben usarse para mejorar el rendimiento, porque ninguna cepa de *PGPB/PGPR* puede rendir mejor en todas las condiciones de cultivo. Dado que la efectividad de la inoculación depende de múltiples factores, incluidas las especies de plantas objetivo y las condiciones climáticas y del suelo, los inoculantes, en teoría, también deben diferenciarse y combinarse de manera adecuada para las condiciones de cultivo, siempre cambiantes.
- Lipopéptidos. Varias *PGPR* producen lipopéptidos con actividad biosurfactante (Raaijmakers et al.,

2010) que inhiben directamente los patógenos y proporcionan resistencia sistémica inducida en los cultivos (Ongena et al., 2007; Ongena & Jacques, 2008). Hay posibilidades de desarrollar productos de lipopéptidos libres de células y biofungicidas en los que parte de la eficiencia del producto se deba a los lipopéptidos suministrados junto con las células vivas, aunque se requiere más exploración de los metabolitos microbianos para obtener más beneficios de estas *PGPB/PGPR*.

- Microbiomas. Los estudios de microbiomas solo han producido hasta el momento conocimientos fundamentales sobre la complejidad de las comunidades microbianas. Se han aislado cepas microbianas beneficiosas capaces de cambiar de manera beneficiosa la estructura de la comunidad microbiana del suelo (Kang et al., 2013; Lopez et al., 2013), pero esta información fundamental aún debe servir como base para la próxima generación de inoculantes (Berg et al., 2013; Berg et al., 2014; Massart et al., 2015).

En resumen, la formulación y aplicación de los inoculantes en campo es una plataforma tecnológica pura que se basa en los principios fundamentales de la microbiología y las ciencias de los materiales. La unión de estos campos permite la creación de productos útiles que continuarán siendo un insumo importante en la agricultura sostenible y en soluciones ambientales correctivas.



Referencias

- Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D. N., Camacho, M., & Temprano, F. J. (2008). Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(11), 2.771-2.779. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.07.021>
- Amer, G. A., & Utkhede, R. S. (2000). Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(9), 809-816. <https://doi.org/10.1139/w00-063>
- Amiet-Charpentier, C., Gadille, P., Digat, B., & Benoit, J. P. (1998). Microencapsulation of rhizobacteria by spray-drying: Formulation and survival studies. *Journal of Microencapsulation*, 15(5), 639-659. <https://doi.org/10.3109/02652049809008247>
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16(4), 729-770. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(98\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(98)00003-2)
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J.-P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant and Soil*, 378(1), 1-33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- Bashan, Y., & Gonzalez, L. E. (1999). Long-term survival of the plant-growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(2), 262-266. <https://doi.org/10.1007/s002530051391>
- Bashan, Y., Hernandez, J.-P., Leyva, L. A., & Bacilio, M. (2002). Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 35(5), 359-368. <https://doi.org/10.1007/s00374-002-0481-5>
- Bashan, Y., & Holguin, G. (1994). Root-to-root travel of the beneficial bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), 2.120-2.131. <http://aem.asm.org/content/60/6/2120.abstract>
- Bashan, Y., & Levanony, H. (1987). Horizontal and vertical movement of *Azospirillum brasilense* Cd in the soil and along the rhizosphere of wheat and weeds in controlled and field environments. *Journal of General Microbiology*, 133(12), 3.473-3.480. <https://doi.org/10.1099/00221287-133-12-3473>
- Bashan, Y., Salazar, B., & Puente, M. E. (2009). Responses of native legume desert trees used for reforestation in the Sonoran Desert to plant growth-promoting microorganisms in screen house. *Biology and Fertility of Soils*, 45(6), 655-662. <https://doi.org/10.1007/s00374-009-0368-9>
- Bashan, Y., Salazar, B., Puente, M. E., Bacilio, M., & Linderman, R. (2009). Enhanced establishment and growth of giant cardon cactus in an eroded field in the Sonoran Desert using native legume trees as nurse plants aided by plant growth-promoting microorganisms and compost. *Biology and Fertility of Soils*, 45(6), 585-594. <https://doi.org/10.1007/s00374-009-0367-x>
- Bashan, Y., Salazar, B. G., Moreno, M., Lopez, B. R., & Linderman, R. G. (2012). Restoration of eroded soil in the Sonoran Desert with native leguminous trees using plant growth-promoting microorganisms and limited amounts of compost and water. *Journal of Environmental Management*, 102, 26-36. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.12.032>
- Ben Rebah, F., Prévost, D., Yezza, A., & Tyagi, R. D. (2007). Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: A review. *Bioresource Technology*, 98(18), 3.535-3.546. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.066>
- Berg, G., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: Looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 5, artículo 148. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00148>
- Berg, G., Zachow, C., Müller, H., Philipps, J., & Tilcher, R. (2013). Next-generation bio-products sowing the seeds of success for sustainable agriculture. *Agronomy*, 3(4), 648-656. <https://doi.org/10.3390/agronomy3040648>
- Brockwell, J. (1977). Application of legume seed inoculants. En R. W. Hardy, & W. Silver (eds.), *A treatise on dinitrogen fixation. Section III, Biology* (pp. 277-309). Wiley and Sons.
- Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, 383(1-2), 3-41. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
- Campos, D. C., Acevedo, F., Morales, E., Aravena, J., Amiard, V., Jorquera, M. A., Inostroza, N. G., & Rubilar, M. (2014). Microencapsulation by spray drying of nitrogen-fixing bacteria associated with lupin nodules. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(9), 2.371-2.378. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1662-8>
- Catroux, G., Hartmann, A., & Revellin, C. (2001). Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant and Soil*, 230(1), 21-30. <https://doi.org/10.1023/A:1004777115628>
- Compant, S., Brader, G., Muzammil, S., Sessitsch, A., Lebrhi, A., & Mathieu, F. (2013). Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. *BioControl*, 58(4), 435-455. <https://doi.org/10.1007/s10526-012-9479-6>
- Covarrubias, S. A., de-Bashan, L. E., Moreno, M., & Bashan, Y. (2012). Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(6), 2.669-2.680. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3585-8>
- Cruz, I., Bashan, Y., Hernández-Carmona, G., & de-Bashan, L. E. (2013). Biological deterioration of alginate beads containing immobilized microalgae and bacteria during tertiary wastewater treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(22), 9.847-9.858. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4703-6>

- Da Silva, M. F., de Souza Antônio, C., de Oliveira, P. J., Xavier, G. R., Rumjanek, N. G., de Barros Soares, L. H., & Reis, V. M. (2012). Survival of endophytic bacteria in polymer-based inoculants and efficiency of their application to sugarcane. *Plant and Soil*, 356(1), 231-243. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1242-3>
- Date, R. A. (2001). Advances in inoculant technology: A brief review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41(3), 321-325. <https://doi.org/10.1071/EA00006>
- Deaker, R., Roughley, R. J., & Kennedy, I. R. (2004). Legume seed inoculation technology—A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8), 1.275-1.288. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.04.009>
- De-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology*, 101(6), 1.611-1.627. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.043>
- De-Bashan, L. E., Hernandez, J. P., & Bashan, Y. (2015). Interaction of *Azospirillum* spp. with microalgae: A basic eukaryotic-prokaryotic model and its biotechnological applications. En F. D. Cassán, Y. Okon, & C. M. Creus (eds.), *Handbook for Azospirillum: Technical issues and protocols* (pp. 367-388). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7_20
- De-Bashan, L. E., Hernandez, J.-P., Morey, T., & Bashan, Y. (2004). Microalgae growth-promoting bacteria as "helpers" for microalgae: A novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Research*, 38(2), 466-474. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.09.022>
- De-Bashan, L. E., Moreno, M., Hernandez, J.-P., & Bashan, Y. (2002). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research*, 36(12), 2.941-2.948. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00522-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00522-X)
- Eiselt, P., Yeh, J., Latvala, R. K., Shea, L. D., & Mooney, D. J. (2000). Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels. *Biomaterials*, 21(19), 1.921-1.927. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00033-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00033-8)
- Escalante, F. M. E., Cortés-Jiménez, D., Tapia-Reyes, G., & Suárez, R. (2015). Immobilized microalgae and bacteria improve salt tolerance of tomato seedlings grown hydroponically. *Journal of Applied Phycology*, 27(5), 1.923-1.933. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0651-0>
- Friel, M. T., & McLoughlin, A. J. (1999). Immobilisation as a strategy to increase the ecological competence of liquid cultures of *Agaricus bisporus* in pasteurised compost. *FEMS Microbiology Ecology*, 30(1), 39-46. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00633.x>
- Gagné-Bourque, F., Xu, M., Dumont, M.-J., & Jabaji, S. (2015). Pea protein alginate encapsulated *Bacillus subtilis* B26, a plant biostimulant, provides controlled release and increased storage survival. *Journal of Fertilizers & Pesticides*, 6(2). <https://doi.org/10.4172/jbfbp.1000157>
- Gaumann, A., Laudes, M., Jacob, B., Pommersheim, R., Laue, C., Vogt, W., & Schrezenmeier, J. (2000). Effect of media composition on long-term *in vitro* stability of barium alginate and polyacrylic acid multilayer microcapsules. *Biomaterials*, 21(18), 1.911-1.917. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00071-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00071-5)
- Hale, L., Luth, M., Kenney, R., & Crowley, D. (2014). Evaluation of pinewood biochar as a carrier of bacterial strain *Enterobacter cloacae* UW5 for soil inoculation. *Applied Soil Ecology*, 84, 192-199. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.08.001>
- Hernandez, J.-P., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2006). Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1-2), 190-198. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.06.005>
- Herrmann, L., & Lesueur, D. (2013). Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(20), 8.859-8.873. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5228-8>
- John, R. P., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Surampalli, R. Y., & Prévost, D. (2011). Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(3), 211-226. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513327>
- Kang, Y., Shen, M., Wang, H., & Zhao, Q. (2013). A possible mechanism of action of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) strain *Bacillus pumilus* WP8 via regulation of soil bacterial community structure. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 59(4), 267-277. <https://doi.org/10.2323/jgam.59.267>
- Kong, H. J., & Mooney, D. J. (2003). The effects of poly(ethyleneimine) (PEI) molecular weight on reinforcement of alginate hydrogels. *Cell Transplantation*, 12(7), 779-785. <https://doi.org/10.3727/000000003108747253>
- Kumaresan, G., & Reetha, D. (2011). Survival of *Azospirillum brasilense* in liquid formulation amended with different chemical additives. *Journal of Phytology*, 3(10), 48-51. <http://updatepublishing.com/journal/index.php/jp/article/download/2725/2704>
- Lee, S.-K., Lur, H.-S., Lo, K.-J., Cheng, K.-C., Chuang, C.-C., Tang, S.-J., Yang, Z.-W., & Liu, C.-T. (2016). Evaluation of the effects of different liquid inoculant formulations on the survival and plant-growth-promoting efficiency of *Rhodospseudomonas palustris* strain PS3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(18), 7.977-7.987. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7582-9>
- Lobo, C. B., Juárez Tomás, M. S., Viruel, E., Ferrero, M. A., & Lucca, M. E. (2019). Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. *Microbiological Research*, 219, 12-25. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.012>
- Lopez, B. R., Bashan, Y., Trejo, A., & de-Bashan, L. E. (2013). Amendment of degraded desert soil with wastewater debris containing immobilized *Chlorella sorokiniana* and *Azospirillum brasilense* significantly modifies soil bacterial community

- structure, diversity, and richness. *Biology and Fertility of Soils*, 49(8), 1.053-1.063. <https://doi.org/10.1007/s00374-013-0799-1>
- Marks, B. B., Megías, M., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2013). Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. *AMB Express*, 3(1), artículo 21. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-21>
- Massart, S., Martínez-Medina, M., & Jijakli, M. H. (2015). Biological control in the microbiome era: Challenges and opportunities. *Biological Control*, 89, 98-108. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.06.003>
- Murphy, J. F., Reddy, M. S., Ryu, C.-M., Kloepper, J. W., & Li, R. (2003). Rhizobacteria-mediated growth promotion of tomato leads to protection against cucumber mosaic virus. *Phytopathology*, 93(10), 1.301-1.307. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.10.1301>
- Nussinovitch, A. (2010). *Polymer macro- and micro-gel beads: Fundamentals and applications*. Springer.
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). Bacillus lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.-L., & Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9(4), 1.084-1.090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>
- Polyak, B., Geresh, S., & Marks, R. S. (2004). Synthesis and characterization of a biotin-alginate conjugate and its application in a biosensor construction. *Biomacromolecules*, 5(2), 389-396. <https://doi.org/10.1021/bm034454a>
- Prithiviraj, B., Zhou, X., Souleimanov, A., Kahn, W., & Smith, D. (2003). A host-specific bacteria-to-plant signal molecule (Nod factor) enhances germination and early growth of diverse crop plants. *Planta*, 216(3), 437-445. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0928-9>
- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 1.037-1.062. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x>
- Rekha, P. D., Lai, W.-A., Arun, A. B., & Young, C.-C. (2007). Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CC-FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-pg104 on plant growth under gnotobiotic conditions. *Bioresource Technology*, 98(2), 447-451. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.01.009>
- Ruiz-Güereca, D. A., & Sánchez-Saavedra, M. del P. (2016). Growth and phosphorus removal by *Synechococcus elongatus* co-immobilized in alginate beads with *Azospirillum brasilense*. *Journal of Applied Phycology*, 28(3), 1.501-1.507. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0728-9>
- Sabaratnam, S., & Traquair, J. A. (2002). Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. *Biological Control*, 23(3), 245-253. <https://doi.org/10.1006/bcon.2001.1014>
- Sarrocco, S., Raeta, R., & Vannacci, G. (2004). Seeds encapsulation in calcium alginate pellets. *Seed Science and Technology*, 32(3), 649-661. <https://doi.org/10.15258/sst.2004.32.3.01>
- Schoebitz, M., Mengual, C., & Roldán, A. (2014). Combined effects of clay immobilized *Azospirillum brasilense* and *Pantoea dispersa* and organic olive residue on plant performance and soil properties in the revegetation of a semiarid area. *Science of The Total Environment*, 466-467, 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.012>
- Schoebitz, M., Osman, J., & Ciampi, L. (2013). Effect of immobilized *Serratia* sp. by spray-drying technology on plant growth and phosphate uptake. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 29(2), 111-119. https://www.researchgate.net/publication/263235206_Effect_of_immobilized_Serratia_sp_By_spray-drying_technology_on_plant_growth_and_phosphate_uptake/link/53d2735c0cf228d363e94265/download
- Schoebitz, M., Simonin, H., & Poncelet, D. (2012). Starch filler and osmoprotectants improve the survival of rhizobacteria in dried alginate beads. *Journal of Microencapsulation*, 29(6), 532-538. <https://doi.org/10.3109/02652048.2012.665090>
- Singleton, P., Keyser, H., & Sande, E. (2002). Development and evaluation of liquid inoculants. En D. Herridge (ed.), *Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam* (pp. 52-66). ACIAR Proceedings.
- Stelling, S. A., Burns, R. G., Sunna, A., & Bunt, C. R. (2014). Survival in sterile soil and atrazine degradation of *Pseudomonas* sp. strain ADP immobilized on zeolite. *Bioremediation Journal*, 18(4), 309-316. <https://doi.org/10.1080/10889868.2014.938723>
- Stephens, J. H. G., & Rask, H. M. (2000). Inoculant production and formulation. *Field Crops Research*, 65(2-3), 249-258. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00090-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00090-8)
- Tanaka, K., Cho, S.-H., Lee, H., Pham, A. Q., Batek, J. M., Cui, S., Qiu, J., Khan, S. M., Joshi, T., Zhang, Z. J., Xu, D., & Stacey, G. (2015). Effect of lipo-chitooligosaccharide on early growth of C₄ grass seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 66(19), 5.727-5.738. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv260>
- Tarek, R., Dayal, T. R., Kaur, B. S., & Danielle, P. (2014). Development of efficient suspension formulation of starch industry wastewater grown *Sinorhizobium meliloti* for agricultural use. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 3(4), 1.083-1.093. https://www.researchgate.net/publication/274961111_Development_of_Efficient_Suspension_Formulation_of_Starch_Industry_Wastewater_Grown_Sinorhizobium_Meliloti_for_Agricultural_Use/link/552d98760cf21acb0921786b/download

- Trejo, A., de-Bashan, L. E., Hartmann, A., Hernandez, J.-P., Rothballer, M., Schmid, M., & Bashan, Y. (2012). Recycling waste debris of immobilized microalgae and plant growth-promoting bacteria from wastewater treatment as a resource to improve fertility of eroded desert soil. *Environmental and Experimental Botany*, *75*, 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.08.007>
- Trivedi, P., & Pandey, A. (2008). Recovery of plant growth-promoting rhizobacteria from sodium alginate beads after 3 years following storage at 4 °C. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *35*(3), 205-209. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0284-7>
- Trivedi, P., Pandey, A., & Palni, L. M. S. (2005). Carrier-based preparations of plant growth-promoting bacterial inoculants suitable for use in cooler regions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *21*(6), 941-945. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-6820-y>
- Truchet, G., Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., de Billy, F., Promé, J.-C., & Dénarié, J. (1991). Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature*, *351*(6.328), 670-673. <https://doi.org/10.1038/351670a0>
- Vassilev, N., Vassileva, M., Azcon, R., & Medina, A. (2001). Application of free and Ca-alginate-entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in a soil-plant system. *Journal of Biotechnology*, *91*(2-3), 237-242. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00341-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00341-8)
- Veselova, S. V., Burkhanova, G. F., Rumyantsev, S. D., Blagova, D. K., & Maksimov, I. V. (2019). Strains of *Bacillus* spp. regulate wheat resistance to greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *55*(1), 41-47. <https://doi.org/10.1134/S0003683819010186>
- Viveganandan, G., & Jauhri, K. S. (2000). Growth and survival of phosphate-solubilizing bacteria in calcium alginate. *Microbiological Research*, *155*(3), 205-207. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(00\)80033-6](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(00)80033-6)
- Wang, L., Khor, E., & Lim, L.-Y. (2001). Chitosan-alginate-CaCl₂ system for membrane coat application. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *90*(8), 1.134-1.142. <https://doi.org/10.1002/jps.1067>
- Wu, Z., Guo, L., Zhao, Y., & Li, C. (2014). Effect of free and encapsulated *Raoultella planticola* Rs-2 on cotton growth promotion under salt stress. *Journal of Plant Nutrition*, *37*(8), 1.187-1.201. <https://doi.org/10.1080/01904167.2014.881865>
- Xavier, I. J., Holloway, G., & Leggett, M. (2004). Development of rhizobial inoculant formulations. *Crop Management*, *3*(1), 1-6. <https://doi.org/10.1094/CM-2004-0301-06-RV>
- Xie, Z. P., Staehelin, C., Vierheilig, H., Wiemken, A., Jabbouri, S., Broughton, W. J., Vogeli-Lange, R., & Boller, T. (1995). Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and nonnodulating soybeans. *Plant Physiology*, *108*(4), 1.519-1.525. <https://doi.org/10.1104/pp.108.4.1519>
- Young, C.-C., Rekha, P. D., Lai, W.-A., & Arun, A. B. (2006). Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid. *Biotechnology and Bioengineering*, *95*(1), 76-83. <https://doi.org/10.1002/bit.20957>
- Zohar-Perez, C., Chernin, L., Chet, I., & Nussinovitch, A. (2003). Structure of dried cellular alginate matrix containing fillers provides extra protection for microorganisms against uvc radiation. *Radiation Research*, *160*(2), 198-204. <https://doi.org/10.1667/rr3027>
- Zohar-Perez, C., Ritte, E., Chernin, L., Chet, I., & Nussinovitch, A. (2002). Preservation of chitinolytic *Pantoea agglomerans* in a viable form by cellular dried alginate-based carriers. *Biotechnology Progress*, *18*(6), 1.133-1.140. <https://doi.org/10.1021/bp025532t>