

# LA BIOFERTILIZACIÓN COMO TECNOLOGÍA SOSTENIBLE

**Arturo Díaz-Franco**  
**Netzahualcóyotl Mayek-Pérez**  
**(coordinadores)**



Primera edición: 2008

- © Arturo Díaz-Franco, Netzahualcóyotl Mayek-Pérez
- © Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
- © Consejo Tamaulipeco de Ciencia y Tecnología
- © Fondos Mixtos
- © Plaza y Valdés, S.A. de C.V.

Derechos exclusivos de edición reservados  
para Plaza y Valdés, S.A. de C.V. Prohibida  
la reproducción total o parcial por cualquier  
medio sin autorización escrita de los editores.

Plaza y Valdés, S.A. de C.V.  
Manuel María Contreras, 73. Colonia San Rafael  
México, D.F., 06470. Teléfono: 5097 20 70  
editorial@plazayvaldes.com  
www.plazayvaldes.com

Calle de Las Eras 30, B.  
28670, Villaviciosa de Odón.  
Madrid, España. Teléfono: 91665 89 59  
madrid@plazayvaldes.com  
www.plazayvaldes.es

ISBN: 978-970-722-706-4

Impreso en México / *Printed in Mexico*

## Índice

Presentación .....	15
Prólogo .....	17
1. Biotecnología de los hongos micorrízicos arbusculares .....	25
<i>R. Ferrera-Cerrato y A. Alarcón</i>	
2. Micorrización del sorgo ( <i>Sorghum bicolor</i> ): impacto en la productividad en Tamaulipas .....	39
<i>A. Díaz-Franco, I. Garza-Cano, V. Pecina-Quintero y A. Magallanes-Estala</i>	
3. Biofertilización bacteriana del pasto buffel .....	55
<i>C. Loredó-Osti, D. Espinosa, R. Ferrera-Cerrato, J. Castellanos y J. Pérez</i>	
4. Biofertilizantes: micorrizas y bacterias promotoras de crecimiento .....	67
<i>V. Olalde-Portugal y R. Serratos</i>	
5. Labranza y biofertilización como manejo de sostenibilidad en la producción de frijol .....	73
<i>J. R. Salinas-García, A. Díaz-Franco e I. Garza-Cano</i>	
6. Crecimiento y rendimiento de sorgo de grano con biofertilización en el centro de Nuevo León .....	83
<i>J. Martínez-Medina</i>	

7. Biotecnología de los hongos ectomicorrízicos . . . . .	93
<i>J. Pérez-Moreno</i>	
8. Respuesta en campo de la inoculación de simbioses y tratamiento con fungicidas a la semilla en soya ( <i>Glycine max</i> ) . . . . .	111
<i>P. Pérez-García, A. Díaz-Franco y N. Maldonado-Moreno</i>	
9. Biofertilizantes microbianos: antecedentes del programa y resultados de validación en México . . . . .	117
<i>J. F. Aguirre-Medina</i>	
10. Aislamiento, selección, producción y evaluación de un inoculante basado en cepas nativas de <i>Azospirillum</i> en el norte de Tamaulipas . . . . .	137
<i>A. Mendoza-Herrera, M. A. Cruz-Hernández, y C. Jacques-Hernández</i>	
11. Efecto de la biofertilización con <i>Azospirillum brasilense</i> en sorgo y maíz en la región semiárida de Tamaulipas, México . . . . .	153
<i>J. G. García-Olivares, V. R. Moreno-Medina, I. C. Rodríguez-Luna, A. Mendoza-Herrera y N. Mayek-Pérez</i>	
12. Inoculantes microbianos sintéticos: ¿son el futuro? . . . . .	167
<i>Y. Bashan, L. E. de Bashan, J. P. Hernández, M. E. Puente, M. Bacilio y L. A. Leyva</i>	

### **Notas Científicas**

1. Respuesta de variedades de cacahuete ( <i>Arachis hypogaea</i> ) a la fertilización química y biológica en un suelo regosol . . . . .	189
<i>A. Durán-Prado, V. López-Galván y O. H. Tosquy-Valle</i>	
2. Respuesta de germoplasma de frijol a la fertilización química y biológica . . . . .	191
<i>A. Durán-Prado, V. López-Galván y J. Cumpián-Gutiérrez</i>	
3. Respuesta de variedades de frijol a la fertilización química y biológica en un suelo fluvisol de Veracruz . . . . .	194
<i>A. Durán-Prado, V. López-Galván y O. H. Tosquy-Valle</i>	

4. Respuesta de variedades de soya a la inoculación con micorriza <i>Glomus intraradices</i> en Veracruz .....	196
<i>A. Durán-Prado, O. H. Tosquy-Valle y V. López-Galván</i>	
5. Efectividad de micorriza arbuscular en genotipos de pasto buffel ( <i>Cenchrus ciliaris</i> ) .....	199
<i>A. Díaz-Franco, I. Garza-Cano y A. Méndez-Rodríguez</i>	
6. Influencia de micorriza arbuscular en el crecimiento y rendimiento de cártamo .....	203
<i>A. Díaz-Franco, A. Ortegón-Morales e I. Garza-Cano</i>	
7. Biofertilización: tecnología sustentable del siglo XXI .....	206
<i>L. Hernández-Flores, J. M. Covarrubias-Ramírez, R. Aveldaño-Salazar y J. J. Peña-Cabriales</i>	
8. Respuesta del maíz y sorgo a la fertilización biológica .....	208
<i>V. Pecina-Quintero, A. Díaz-Franco e I. Garza-Cano</i>	
9. Efecto de la micorriza arbuscular en sorgo bajo dos condiciones de humedad .....	211
<i>V. Pecina-Quintero, A. Díaz-Franco e I. Garza-Cano</i>	
10. Efecto de una composta y ácidos fúlvicos en la producción de lilies ( <i>Lilium</i> sp.) en el sureste de Coahuila .....	214
<i>M. R. Zúñiga-Estrada, J. M. Covarrubias-Ramírez y R. López-Cervantes</i>	
11. Transferencia tecnológica del maíz QPM y el biofertilizante en la Huasteca hidalguense .....	217
<i>J. P. Pérez-Camarillo, G. Zacatenco-González, R. Galván-Parra y R. Aveldaño-Salazar</i>	
12. Producción y evaluación de un biofertilizante ( <i>Azospirillum</i> spp.) para el noreste de México .....	220
<i>J. G. García, A. Mendoza, C. Jacques, A. Cruz y F. Serrano</i>	

13. Respuesta del sorgo a la inoculación de <i>Glomus intraradices</i> en campo .....	222
<i>A. Magallanes-Estala</i>	
14. Rentabilidad del sorgo mediante la inoculación de simbiontes en suelo con y sin fertilización química .....	224
<i>A. Magallanes-Estala, A. Díaz-Franco y V. Olalde-Portugal</i>	
15. Evaluación de biofertilizantes en cártamo .....	227
<i>A. Magallanes-Estala, A. S. Ortegón-Morales y A. Díaz-Franco</i>	
16. Interacción de <i>Azospirillum brasilense</i> , nitrógeno y azúcar en canola de riego bajo labranza convencional y de conservación .....	230
<i>M. Cepeda-Villegas, E. Venegas-González y B. Gómez-Lucatero</i>	
17. Respuesta del maíz al tratamiento con <i>Azospirillum brasilense</i> y nitrógeno bajo labranza de conservación .....	233
<i>M. Cepeda-Villegas y E. Venegas-González</i>	
18. Efecto estimulante de bacterias esporuladas sobre crecimiento y desarrollo del chile jalapeño ( <i>Capsicum annum</i> ) en invernadero y campo .....	236
<i>N. García-Licona, G. Gallegos-Morales, M. Cepeda-Siller y F. D. Hernández-Castillo</i>	
19. Resultados preliminares de la evaluación de biofertilizantes en maíz QPM .....	238
<i>J. E. Cervantes-Martínez</i>	
20. Efecto de biofertilizantes sobre el rendimiento del maíz .....	241
<i>C. A. Reyes-Méndez y M. A. Cantú-Almaguer</i>	
21. Evaluación combinada de inoculantes microbiológicos y fertilizantes químicos en el cultivo de sorgo .....	244
<i>O. M. Carrillo-Rendón, M. E. Salazar-Durán, I. Machuca-Orta y C. Jacques-Hernández</i>	

22. Biofertilización en sorgo de temporal en la zona media de San Luis Potosí .....	246
<i>A. Ramiro-Córdova y C. Jasso-Chaverría</i>	
23. Simbiosis <i>Rhizobium</i> -micorriza arbuscular y uso de brassinoesteroide en frijol .....	249
<i>C. Jasso-Chaverría y M. A. Martínez-Gamiño</i>	
24. Efecto del biofertilizante y la preparación del suelo en la producción de maíz, sorgo y sorgo x Sudán en la zona media potosina .....	251
<i>M. A. Martínez-Gamiño y C. Jasso-Chaverría</i>	
25. Biofertilización por goteo a base de guano en cultivos diversos bajo un sistema hidropónico con producción de tilapia en Xalisco, Nayarit .....	254
<i>A. Betancourt-Vallejo, P. D. Flores-Peña, V. M. González-Velásquez, R. Quezada-Morales, V. Jiménez-García y R. Gómez Aguilar</i>	

## 12

### Inoculantes microbianos sintéticos: ¿son el futuro?

*Yoav Bashan, Luz E. de Bashan,  
Juan Pablo Hernández,  
Ma. Esther Puente, Macario Bacilio  
y Luis A. Leyva\**

#### Resumen

***D**urante las últimas dos décadas se han evaluado varias formulaciones experimentales basadas en polímeros. Estos polímeros han demostrado su potencial como portadores bacterianos, presentando ventajas sustanciales sobre la turba. Estas formulaciones encapsulan las células vivas (como se describe más adelante) y protegen a los microorganismos contra estreses ambientales; adicionalmente, cuando los polímeros son degradados por los microorganismos del suelo, se liberan los microorganismos encapsulados de manera gradual pero en grandes cantidades, usualmente cuando la semilla germina y emerge la plántula. Estas formulaciones presentan muchas ventajas, ya que pueden almacenarse secas a temperatura ambiente por periodos prolongados, ofrecen una calidad constante y un mejor ambiente para las bacterias, y pueden ser manipuladas fácilmente de acuerdo con las necesidades específicas de las bacterias. Estos inoculantes pueden complementarse con nu-*

*\*Grupo de Microbiología Ambiental, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, 23090, México e-mail: bashan@cibnor.mx*



*trientes para mejorar así la sobrevivencia a corto plazo de las bacterias una vez inoculados, lo cual es esencial para el éxito del proceso de inoculación, especialmente con bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB) asociativas. Sin embargo, una importante restricción para la industria de los inoculantes es que los polímeros son costosos, comparados con los inoculantes basados en turba y requieren mayor manipulación por la industria. De esta manera, aun compañías relativamente grandes que manufacturan inoculantes no han adoptado esta técnica por completo.*

### **Formulaciones encapsuladas**

El proceso de encapsular microorganismos dentro de una matriz polimérica está aún en etapa de experimentación en el campo de la tecnología de inoculantes bacterianos. Hasta el presente, no hay productos bacterianos comerciales que hagan uso de dicha tecnología. El concepto detrás de la inmovilización de células microbianas es el de atrapar los microorganismos benéficos dentro de una matriz. La formulación (bacteria-matriz) es entonces fermentada en un medio de crecimiento bacterial. Estas formulaciones pueden producir muchos compuestos útiles para la industria y para aplicaciones ambientales (tales como ácidos orgánicos, aminoácidos, enzimas) y biodegradar materiales tóxicos (biorremediación) por un extenso periodo.

### **Micro y macroformulaciones de alginato**

El alginato es el material utilizado más comúnmente para encapsular microorganismos. El inóculo resultante es usado para varios propósitos, entre estos la inmovilización de organelos celulares y enzimas, la aplicación de agentes de control biológico y micoherbicidas, la biorremediación de aguas, el aumento de la estabilidad de plásmidos recombinantes en la célula hospedera, en la investigación de quimiotaxis bacteriana y el cultivo de hongos (Bashan, 1998; De-Bashan *et al.*, 2004). El alginato es un polímero natural compuesto de ácido D-manurónico y ácido L-glucurónico, y puede extraerse de diferentes macroalgas (De-Lucca *et al.*, 1990) así como de varias bacterias (Smidsrod y Skjak-Braek, 1990). Debido a la producción masiva de alginato en el lejano oriente, su costo se ha reducido, haciéndolo potencialmente más atractivo para la industria de inoculantes. La preparación de macroesferas (de 2-4 mm) con bacterias es bastante fácil e involucra un procedimiento con varios pasos a seguir

(Bashan, 1986; Digat, 1991; De-Bashan *et al.*, 2004) (figura 12.1). En los casos donde la biomasa de la cepa encapsulada es baja, se requiere un paso adicional de multiplicación secundaria de las bacterias dentro de las esferas ya formadas (Bashan, 1986). Una vez seca, la preparación puede almacenarse a temperatura ambiente por muchos años (Bashan y González, 1999). Se ha intentado desarrollar algunas otras preparaciones basadas en alginato para encapsular hongos micorrízico-arbusculares (MA) (Garny *et al.* 1982), hongos ectomicorrízicos (Marx y Kennedy, 1982; Le Tacon *et al.*, 1985), para inoculación con *Frankia* (Sougofara, 1989) y para hongos utilizados como agentes de biocontrol contra patógenos del suelo (Fravel *et al.*, 1985; Lewis y Papavizas, 1985). Las principales ventajas que presentan las preparaciones de alginato son su naturaleza no tóxica, su biodegradabilidad y la capacidad de liberar de manera lenta los microorganismos en el suelo (Bashan, 1986; Kitamikado *et al.*, 1990). Esta tecnología fue utilizada para encapsular las bacterias benéficas *A. brasilense* y *P. fluorescencia* (Bashan, 1986), las cuales fueron más tarde utilizadas para inocular de manera exitosa plantas de trigo bajo condiciones de campo. Las bacterias sobrevivieron en el campo y sus poblaciones fueron comparables con las de bacterias originadas en inoculantes de turba (Bashan *et al.*, 1987). El alginato ha sido también usado en la encapsulación de una mezcla de microalgas y PGPB para el tratamiento de aguas residuales (Bashan *et al.*, 2002, 2004). El encapsulamiento de *P. fluorescens* modificado genéticamente, el cual fue liberado en el suelo, mostró un aumento

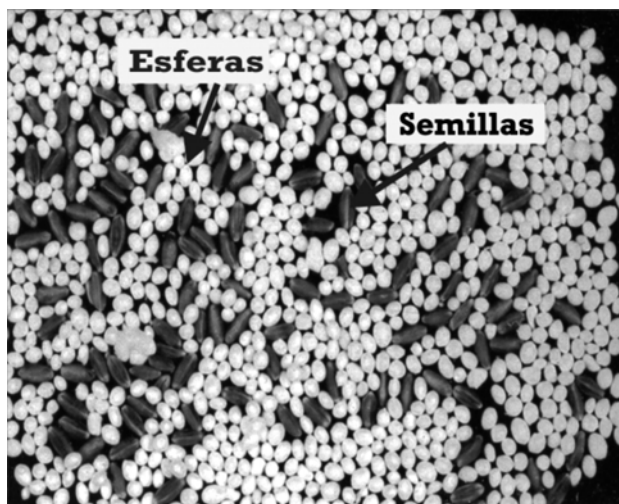


Figura 12.1. Inoculante de alginato mezclado con semillas de trigo, antes de la siembra.

significativo en la tasa de sobrevivencia en comparación con células no encapsuladas, después de tres meses. Más aún, la adición de arcilla y leche descremada a las esferas aumenta significativamente la sobrevivencia bacteriana en comparación con esferas de alginato solo. La colonización de raíces de trigo por células benéficas liberadas de las esferas fue superior a la alcanzada por inoculación directa en el suelo. Estos estudios proporcionan clara evidencia de que las esferas de alginato son eficientes portadores para la inoculación de plantas, proporcionando un ambiente protector en el suelo. El número de *P. fluorescens* disminuye solo moderadamente en el suelo cuando las células fueron encapsuladas, mientras que se observó una mayor reducción en el número de bacterias cuando se utilizó un inóculo no encapsulado. De igual forma, cuando la bacteria está encapsulada presenta solo una ligera pérdida por lavado, comparada con las bacterias inoculadas libres. La mayoría de las células encapsuladas permanecen en la zona de la raíz (van Elsas *et al.*, 1991, 1992). Otro ejemplo reciente es la colonización de raíces de tomate con *P. fluorescens* embebidas en esferas de alginato para producir una preparación de biocontrol en contra del marchitamiento bacteriano del tomate (Aino *et al.*, 1997). Trevors *et al.* (1992) propusieron que una buena sobrevivencia y colonización rizosférica, una tasa baja de pérdida por lavado y la resistencia al secado muestran el potencial que el uso de alginato tiene en la inoculación bacteriana. Las preparaciones de alginato pueden haber solucionado muchos problemas asociados con los inoculantes tradicionales de turba. En el cuadro 12.1 se presenta una comparación entre las características de formulaciones básicas de alginato y formulaciones de turba.

<b>Cuadro 12.1. Comparación entre inoculante de alginato e inoculante de turba</b>	
<i>Alginato</i>	<i>Turba</i>
-No existe tecnología industrial barata.	-Existen varios procesos industriales exitosos.
-Uniforme química y físicamente.	-No uniforme (materia orgánica compleja).
-Biodegradable en el suelo.	-Biodegradable en el suelo.
-De uso simple por los agricultores.	-De uso simple por los agricultores.
-Materia prima barata.	-Materia prima barata.
-Puede ser producido fácilmente por la industria.	-Es producido fácilmente por la industria.
-No produce contaminación ambiental, no es tóxico y es biodegradable.	-No produce contaminación ambiental, aumenta ligeramente la materia orgánica en el suelo, no es tóxico y es biodegradable.

*Continúa...*

INOCULANTES MICROBIANOS SINTÉTICOS: ¿SON EL FUTURO?

...continuación

<ul style="list-style-type: none"> <li>-Produce una colonización con PGPB más consistente (a nivel experimental).</li> <li>-La fuerza de la esfera y la liberación de bacterias están controladas y pueden ser fácilmente manipuladas durante la formulación.</li> <li>-El control de calidad es técnicamente simple.</li> <li>-Largo tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente.</li> <li>-Requiere poco espacio de almacenamiento.</li> <li>-No puede contaminarse después de la producción.</li> <li>-Largo tiempo de sobrevivencia en suelo bajo capacidad de carga hídrica.</li> <li>-Resistente a cambios en la humedad.</li> <li>-No hay efecto directo del alginato en el crecimiento de la planta.</li> <li>-Es posible adicionar nutrientes para bacterias auxotróficas o acomodar requerimientos nutricionales de algunas bacterias. La nutrición también aumenta el tiempo de sobrevivencia.</li> <li>-Puede soportar una carga de bacterias de hasta <math>10^{11}</math> UFC/g inoculante.</li> <li>-Las bacterias en las esferas están secas hasta el periodo de lluvias. La germinación de la semilla después de la lluvia viene acompañada de la “reactivación” de la bacteria.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Produce una colonización errática con algunas PGPB, es más consistente con <i>Rhizobium</i> aún bajo uso comercial.</li> <li>-La liberación de bacterias no puede ser controlada.</li> <li>-Es difícil mantener la misma calidad entre lotes.</li> <li>-Limitado tiempo de almacenamiento aún a 5°C (cerca de un año en condiciones no estériles y dos años en condiciones estériles).</li> <li>-Ocupa un gran volumen.</li> <li>-Fácilmente contaminable bajo condiciones inapropiadas de almacenamiento; contiene toda clase de contaminantes especialmente en preparaciones comunes no estériles.</li> <li>-La sobrevivencia de rizobias es sólo suficiente para colonizar la raíz.</li> <li>-Susceptible a cambios en humedad.</li> <li>-Algunos tipos de turba inhiben el crecimiento de las plantas.</li> <li>-Solo las preparaciones estériles pueden complementarse nutricionalmente.</li> <li>-Los inoculantes normalmente no exceden las <math>10^8</math> UFC/g inoculante.</li> <li>-Necesita condiciones húmedas inmediatamente después de la aplicación.</li> </ul>
--	---

El uso de macroesferas de alginato tiene dos desventajas principales: 1) necesitan un tratamiento adicional durante la siembra y 2) las bacterias deben moverse a través del suelo hacia las plantas. Las restricciones a su uso pueden ser de diversas causas;

así, en países desarrollados un agricultor que está ya de por sí ocupado durante la siembra, puede verse presionado en términos de tiempo y ser renuente a incurrir en los gastos adicionales que este tipo de inoculantes significa; en países en desarrollo, por otra parte, el agricultor puede no inocular las semillas de ninguna manera, debido fundamentalmente a una insuficiente educación en agricultura y a tradiciones conservadoras que lo hacen sospechar desfavorablemente de las nuevas tecnologías, especialmente aquellas que involucran bacterias vivas. En prácticas agrícolas, cuando las esferas se mezclan libremente con las semillas y se siembran de manera conjunta, las esferas pueden caer lejos de la semilla (hasta algunos centímetros) (figura 12.2). Las bacterias liberadas de las esferas deben moverse a través del suelo, encarando la competencia de la flora nativa y algunas veces la ausencia de una película continua de agua necesaria para su movimiento. Estas distancias pueden ser restrictivas para muchas bacterias benéficas, aún aquellas con movilidad probada en el suelo, tal como *Azospirillum*. Para superar tales dificultades, recientemente se concibió el concepto de microesfera. Si las esferas son suficientemente pequeñas pero aún son capaces de encapsular un número significativo de bacterias, será posible producir una formulación en forma de polvo. La semilla puede ser cubierta con una especie de “polvo de esferas” en las fábricas productoras de semillas y venderse a los agricultores en los países en desarrollo como “semillas mejoradas”. Las semillas cubiertas (con fertilizantes o fungicidas) son comunes y aceptadas en la mayoría de áreas rurales de México. En las prácticas agrícolas a gran escala de países desarrollados como Estados Unidos, las semillas precubiertas eliminarían la necesidad de un tratamiento de campo adicional y más costoso, de manera que serían convenientes para los productores. Sin duda alguna, el recubrir las semillas con bacterias no es un trabajo industrial fácil (Paul *et al.*, 1991); sin embargo, una idea similar, pero con inoculante de turba,



Figura 12.2. Semillas e inoculante de alginato después de la siembra en el campo.

se ha aplicado ya para preinoculación de leguminosas forrajeras tales como alfalfa. La turba se aplica a la semilla en forma de suspensión utilizando un adhesivo y la semilla inoculada se cubre con una fina capa de carbonato de calcio (Brockwell, 1977).

La producción de microesferas de alginato es simple y se obtienen al rociar la solución de alginato a través de una punta muy fina (Bashan *et al.*, 2002). Esta tecnología produce esferas de un tamaño de 50 a 200  $\mu\text{m}$ , en las cuales quedan atrapadas un número significativo de bacterias (aproximadamente  $10^8$  a  $10^9$  UFC  $\text{g}^{-1}$ ), similar a los valores que se obtienen en macroesferas de alginato (Bashan, 1989). En detalle, Bashan *et al.* (2002), desarrollaron un método para inocular semillas secas y húmedas con PGPB usando microesferas de alginato como sustrato y *A. brasilense* como el modelo de PGPB. Las microesferas fueron producidas por aspersión a baja presión a través de una punta muy fina, de una solución de alginato mezclada con el cultivo bacteriano líquido inoculado en un medio de crecimiento rico, lo cual dio como resultado unas gotas de diámetro pequeño. Estas gotas, una vez en contacto con una solución de cloruro de calcio, se endurecen inmediatamente formando microesferas con diámetros que van de 100 a 200  $\mu\text{m}$  (figura 12.3). Aunque en el proceso mueren

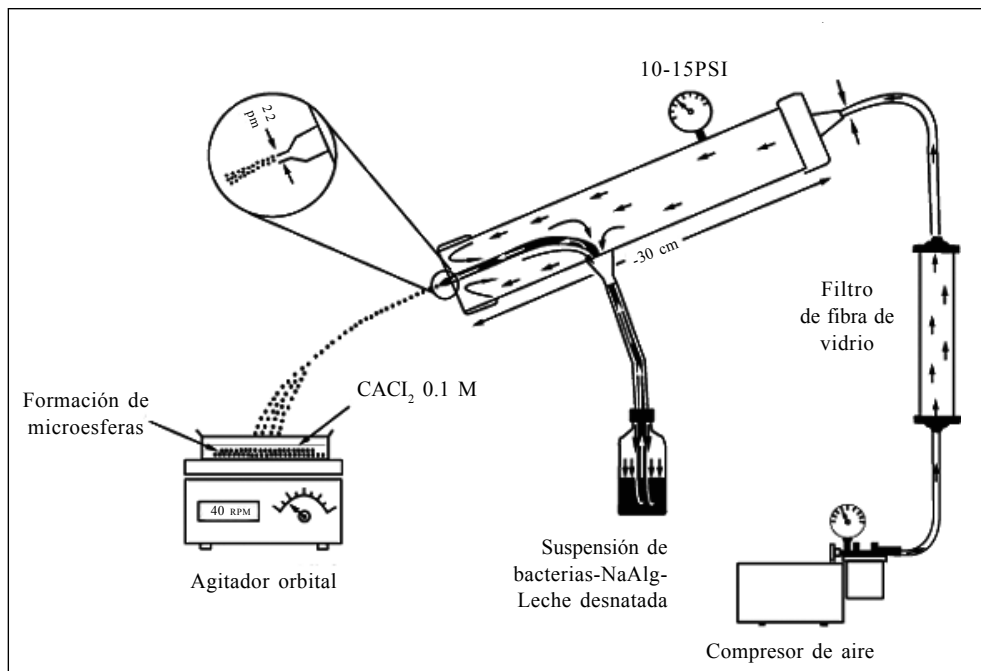


Figura 12.3. Equipo para la producción de microesferas. El diseño original es reproducido de Bashan *et al.* (2002), con permiso del editor.

parte de las bacterias atrapadas, el número de bacterias sobrevivientes dentro de la microesfera ( $> 10^{11}$  UFC  $g^{-1}$  de esferas) es suficiente para la inoculación de semillas (figura 12.4). Más aún, se encontró que la población bacteriana en el inoculante puede ser aumentada por medio de una multiplicación secundaria en el mismo medio de crecimiento, incubando las microesferas por 16 horas más (figura 12.5). También

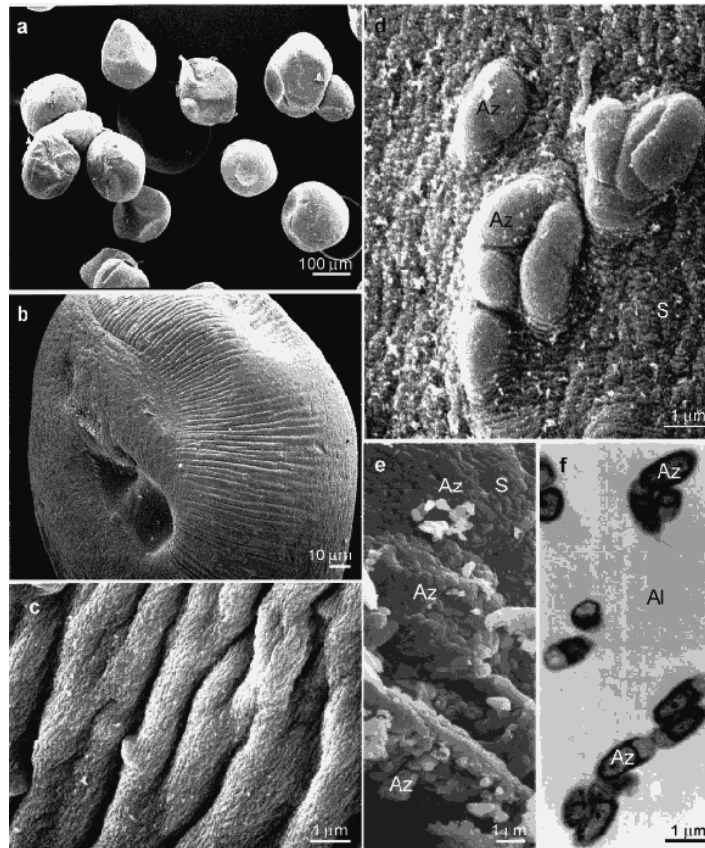


Figura 12.4. Microscopía electrónica de barrido de las microesferas. *a)* Las microesferas después de la formación y endurecimiento con y sin bacterias se ven similares a esta magnificación; *b)* una microesfera sin bacterias; *c)* un acercamiento a la superficie de una microesfera sin bacterias; *d)* microcolonias de *A. brasilense* Cd en la superficie de microesferas húmedas; *e)* microcolonias de *A. brasilense* Cd en la superficie de una microesfera seca por liofilización; *f)* microscopía electrónica de transmisión de *A. brasilense* Cd dentro de la microesfera húmeda. Al=alginate, Az=*A. brasilense* Cd, S=superficie de la microesfera. Estos datos fueron publicados originalmente en Bashan *et al.* (2002).

se encontró que las microesferas pueden utilizarse tanto secas como húmedas. El inoculante seco se obtuvo usando aire seco a 38 °C, creando así una especie de polvo con una carga  $> 10^9$  UFC g<sup>-1</sup> de esferas. Como forma alternativa, las microesferas secas también se produjeron usando un procedimiento estándar de secado por congelación. Esta preparación seca fue adherida fácilmente a la superficie seca de la semilla, adicionando lecitina diluida al 1% en alcohol, o con adhesivo sintético para papel (Resistol) al 0.5% (figura 12.6). Las bacterias se liberaron de las microesferas lentamente en cantidades que variaron entre  $10^4$  a  $10^6$  UFC g<sup>-1</sup>, dependiendo del tipo de esfera (seca o húmeda, con o sin leche descremada) y del tiempo de incubación (a mayor tiempo de incubación, menor la cantidad de bacteria liberada) (cuadro 12.2). El inoculante, tanto seco como húmedo, aumenta el desarrollo de plántulas de trigo y tomate que crecen en suelo no fértil (figura 12.7) y son biodegradadas en 15 días en suelo húmedo (figura 12.8). Hasta el momento, parece que el alginato es el más promisorio de los materiales de encapsulación analizados. Sin embargo, debido a lo limitado de la investigación publicada acerca de las esferas de alginato para usos agrícolas y debido a sus posibles deficiencias, especialmente con relación a su alto precio en comparación con la turba, es prematuro predecir si el alginato desplazará a la turba en la industria de inoculación o permanecerá sólo en el dominio de la microbiología industrial y ambiental.

### **Encapsulación con otros materiales**

Aunque las preparaciones comerciales de alginato no están disponibles para la inoculación bacteriana en plantas, algunos otros materiales, los cuales son usados también en microbiología ambiental e industrial, pueden considerarse como sustitutos cuando los microorganismos no pueden adaptarse a las preparaciones de alginato. Hasta donde sabemos, casi ninguno de éstos ha sido probado en suelo o en campo. Sin embargo, este ensayo debe señalar su existencia para promover futuras investigaciones en estos portadores. En el cuadro 12.3 se presenta una lista de nueve materiales con potencial como portadores, sus características básicas, ventajas y limitaciones.

### **Portadores secos sintéticos**

El principal objetivo de encapsular bacterias es aumentar su tiempo de sobrevivencia durante el almacenamiento (no el número bacteriano, el cual disminuye durante el



**Cuadro 12.2. Liberación lenta de *A. brasilense* Cd de las microesferas húmedas y secas.**

Concentración de bacterias (UFC/g) en microesferas producidas a diferentes tiempos									
Tipo	10 min		24 h		144 h		240 h		
	húmedas	secas	húmedas	secas	húmedas	secas	húmedas	secas	
Alginato + leche desnatada	9.2+0.3x10 <sup>5a</sup>	25+12 <sup>c</sup>	2.2+0.3x10 <sup>5</sup>	3.7+0.6x10 <sup>3</sup>	2.1+0.6x10 <sup>5</sup>	2.3+0.4x10 <sup>5</sup>	7.2+0.2x10 <sup>4</sup>	6.3+0.1x10 <sup>5</sup>	2.7+0.6x10 <sup>5</sup>

<sup>a</sup> La concentración inicial de bacterias en esferas de alginato húmedas fue de 2x10<sup>11</sup>

<sup>b</sup> La concentración inicial de bacterias en esferas de alginato más leche desnatada fue de 2.2x10<sup>11</sup>

<sup>c</sup> La concentración inicial de bacterias en esferas de alginato secas fue de 3x10<sup>9</sup>

<sup>d</sup> La concentración inicial de bacterias en esferas de alginato secas más leche desnatada fue de 3.9 x 10<sup>9</sup>

UFC unidades formadoras de colonias. Estos datos fueron publicados originalmente en Bashan *et al.* (2002)

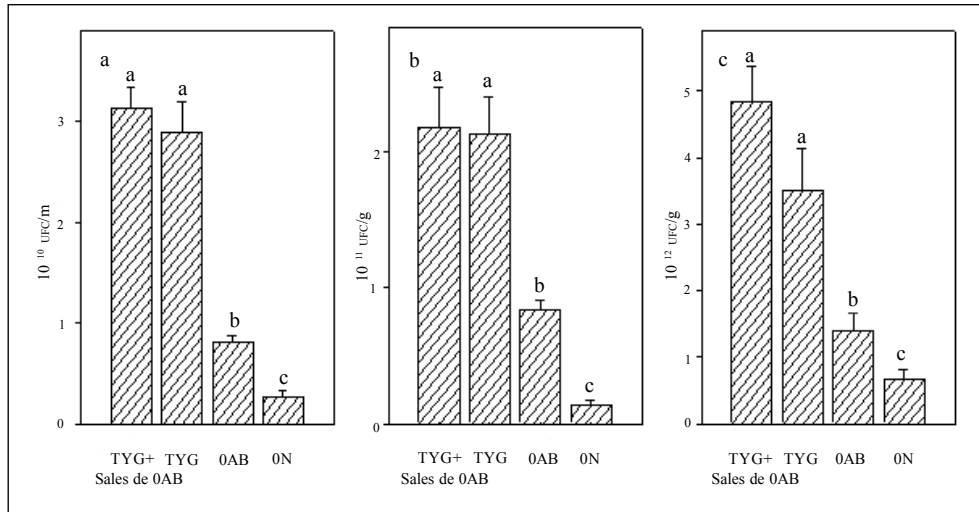


Figura 12.5. *a)* Desarrollo de *A. brasilense* Cd varios medios de crecimiento. *b)* Número de bacterias encapsuladas en microesferas usando el mismo medio como parte estructural de la esfera. *c)* Número de bacterias en diferentes microesferas, después de un periodo de crecimiento adicional dentro de las esferas inoculadas en el mismo medio. Las barras denotadas con letras diferentes difieren significativamente a  $p < 0.05$  según el análisis de varianza de una vía. Las barras de error representan el error estandar. TYG=medio Triptona-Extracto de levadura-Glucosa; 0AB=medio libre de N complementado con fructosa y  $\text{NO}_3^-$ ; NB=caldo nutritivo; UFC=unidades formadoras de colonias. Estos datos fueron publicados originalmente en Bashan *et al.* (2002).

proceso). Hasta la fecha, la solución más común al problema del tiempo de sobrevivencia han sido las preparaciones secadas con aire seco o liofilizadas (Bashan, 1986; Bashan *et al.*, 1987; 2002; Fages 1992; Kosanke *et al.*, 1992). El menor contenido de agua en el producto final es responsable por la sobrevivencia a largo plazo durante el almacenamiento. De esta manera, las bacterias en la formulación permanecen inactivas, resistentes al estrés ambiental, insensibles a la contaminación y más compatibles con la aplicación de fertilizantes (Paau, 1988). La fase de deshidratación es tal vez la más crítica de todo el proceso de preparación de la formulación, especialmente para bacterias que no forman esporas. La sobrevivencia bacterial se ve afectada por distintas variables: el medio de cultivo usado para el cultivo bacteriano, el estado fisiológico de las bacterias cuando son cosechadas del medio, el proceso de encapsulación, el uso de materiales protectores, el tipo de tecnología de secado usada y la tasa de deshidratación (Fages, 1990; Paul *et al.*, 1993). Si se deshidrata apropiada-

mente, la vida de anaquel de la formulación seca es mucho mayor que cualquier producto de turba (Shah-Smith y Burns, 1997). Desde el punto de vista comercial e industrial, la extremadamente larga sobrevivencia de la bacteria en estas preparaciones hace a las formulaciones secas extremadamente atractivas. Al estudiar el efecto de la deshidratación en células de *Azospirillum* encapsuladas, Paul *et al.* (1993) demostraron que una gran proporción de las células se destruyen durante la deshidratación. Sin embargo, cuando hay una deshidratación apropiada, las células sobrevivientes son suficientes para la inoculación. Un beneficio adicional es que las bacterias sobreviven por casi un año sin disminuir su población. Las esferas de alginato seco que contienen *A. brasilense* y *P. fluorescens* producidas en 1983 (Bashan, 1986), y las cuales fueron preservadas para propósitos de archivo, mantuvieron su población bacteriana por 14 años, aunque a un menor nivel que al tiempo de la encapsulación (Bashan y González, 1999). Una alternativa a los inoculantes sintéticos secos puede ser el polvo de arcilla con características y ventajas similares a aquellos de los portadores sintéticos, ya que con la tecnología actual, son más efectivos en términos de costos (R.S. Smith, 1995, comunicación personal).

## Conclusiones y perspectivas futuras

Los inoculantes microbianos han sido incorporados en prácticas de campo en todo el mundo, con resultados satisfactorios, especialmente para *Rhizobium*. Comparando con aplicaciones químicas en la agricultura, su presente impacto en los agromercados es pequeño. Sin embargo, la industria de agroquímicos está más abierta ahora al concepto de inoculantes bacterianos que antes. Hay un interés genuino en desarrollar productos bacterianos que sean confiables y que puedan actuar como complementos a los químicos que hay actualmente en el mercado. La investigación y los limitados intentos de uso en campo de las PGPB en las últimas dos décadas han abierto nuevos horizontes para la industria de la inoculación. Es relativamente fácil aislar el antagonista bacteriano de un fitopatógeno, o encontrar una bacteria que aumente el desarrollo de las raíces. Sin embargo, los métodos para identificar las bacterias óptimas para estas tareas son poco conocidos, y menos aún se conoce acerca de su rizocompetencia y otras características requeridas de bacterias potencialmente benéficas para sobrevivir, y su función en su nuevo ambiente. Un desafío adicional es el de desarrollar portadores mejorados que consistentemente proporcionen un alto número bacteriano bajo condiciones de campo; extender su tiempo de vida en almacenamiento; que sean fáciles de usar y efectivos en términos de costos (Smith, 1992).

INOCULANTES MICROBIANOS SINTÉTICOS: ¿SON EL FUTURO?

<b>Cuadro 12.3. Encapsulación y otros materiales diferentes al alginato como potenciales portadores para inoculantes bacterianos para la agricultura</b>				
<i>Material</i>	<i>Ventajas</i>	<i>Limitaciones</i>	<i>Uso</i>	<i>Referencias</i>
K-carragenina.	Es posible obtener una mayor densidad celular en las esferas que en el cultivo bacteriano original.	La relativamente alta temperatura necesaria para formar las esferas puede matar a las bacterias.	Levadura para producción de etanol y <i>E. coli</i> , <i>Serratia marcescens</i> y <i>Acetobacter suboxydans</i> para producción de ácido L-aspártico, L-isoleucina, L-sorbosa y etanol.	De Taxis du Poet <i>et al.</i> (1986); Nasri <i>et al.</i> (1987).
Poliacrilamida.	Fácilmente disponible.	Costoso. Los monómeros son tóxicos y su baja degradabilidad lo hace una desventaja desde el punto de vista ambiental.	Usado para la encapsulación de <i>Enterobacter aerogenes</i> para la síntesis de ácido corísmico o para inoculación de <i>Rhizobium</i> en leguminosas.	Keller y Lingens (1984).
Agar y agarosa.	Los dos fácilmente disponibles.	Costosos. Temperatura de solidificación relativamente alta. Lenta degradación.	Encapsulación de <i>Azospirillum brasilense</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	Bashan (1982), datos no publicados.
Goma Xantan-carob.	Proporciona buena protección a las bacterias.	Desconocidas.	Inóculo de <i>Rhizobium</i> , así como <i>Agrobacterium</i> y <i>Arthrobacter</i> .	Jung <i>et al.</i> (1982); Mugnier y Jun (1985).
Espónja de poliuretano.	No estudiadas.	No estudiadas.	Atrapamiento de células de <i>Rhodococcus chlorophenolicus</i> y <i>Flavobacterium</i> sp. para degradar pentaclorofenol.	Briglia <i>et al.</i> (1990).
Vermiculita.	Esterilización por calor; alta capacidad para retener agua, puede prepararse en diferentes tamaños; las células son retenidas dentro del material poroso y liberadas directamente en el suelo; no se degrada; con el tiempo se incorpora en el suelo circundante.	Tiende a caerse de las semillas, no se mezcla bien con ellas y puede acumularse en el sitio de cultivo y detener el flujo de semillas.	Usada con ectomicorrizas y <i>Rhizobium</i> ; ya se han lanzado formulaciones comerciales.	Marx y Kenney (1982).
Polisacáridos adhesivos.	No estudiadas.	No estudiadas.	<i>Bacillus circulans</i> congelado en seco, fue adicionado a semillas de maíz cubiertas con polisacáridos de la misma bacteria antes de la siembra.	Berge <i>et al.</i> (1990).
Flóculos bacteriano.	No estudiadas.	No estudiadas.	Sistema de distribución para <i>Azospirillum</i> y <i>Rhizobium</i> .	Neyra <i>et al.</i> (1995).

La mayoría de inoculantes hoy en día, se usan para inocular leguminosas y en menor extensión, para cereales. El mercado dicta que los inoculantes deben ser tan baratos como sea posible. El costo de desarrollar un nuevo material inoculante rápidamente mueve el precio fuera del rango de su uso práctico en agricultura, especialmente en países en desarrollo. Sin embargo, existen varios mercados especializados tales como cultivos de flores y frutas y vegetales orgánicos donde los productos químicos son indeseables o son de uso restringido. Los cultivos de invernadero son también objetivos primordiales para los inoculantes comerciales. Dado que estos cultivos a menudo crecen en suelos desinfectados o en algunos casos sin suelo pero con una alta carga de insumos, el costo adicional de inoculación no constituirá un costo extra para el productor. Al mismo tiempo, este tipo de cultivos evita todas las dificultades que se originan de la interacción de los inoculantes con el suelo.

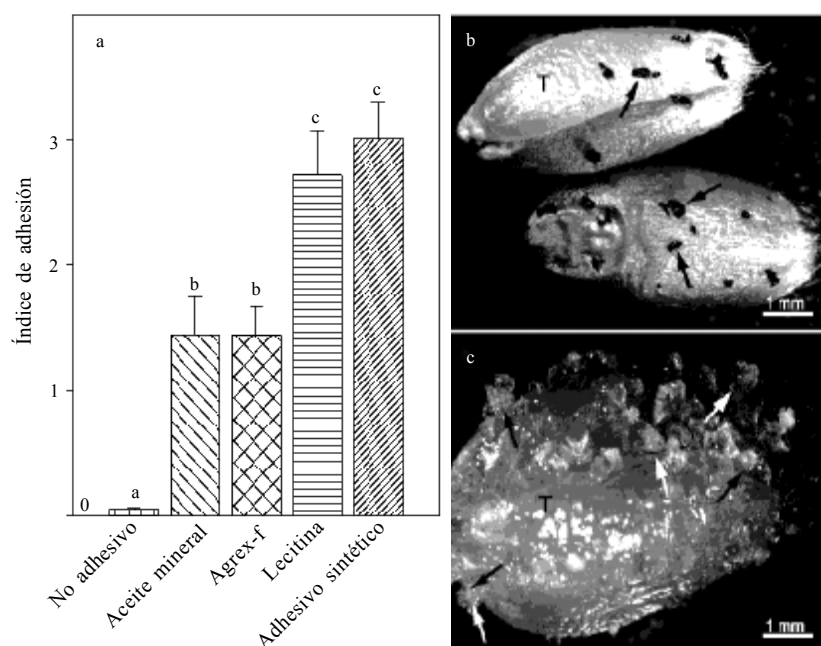


Figura 12.6. *a)* Adherencia de la microsfera seca a la superficie de la semilla usando cuatro diferentes agentes adhesivos. Las barras denotadas por letras diferentes difieren significativamente a  $p < 0.05$  según el análisis de varianza de una vía. Las barras de error representan el error estándar. *b)* Adherencia por medio de lecitina de microsferas secadas por calor a semillas de trigo; las microsferas se tiñeron con azul de metileno al 1% para obtener una mejor visualización. *c)* Adherencia por medio de lecitina de esferas secas por liofilización a semillas de trigo (W). Las flechas indican microsferas. Estos datos fueron publicados originalmente en Bashan *et al.* (2002).

## INOCULANTES MICROBIANOS SINTÉTICOS: ¿SON EL FUTURO?

Más aún, estos mercados, si se desarrollan apropiadamente, pueden representar una oportunidad para nuevos inoculantes de PGPB. Parece que para la inoculación de leguminosas inoculadas con rizobias, el desarrollo de inoculantes será la mejor opción por algún tiempo, ya que es improbable la expresión de la nitrogenasa en plantas en el futuro previsible. De la misma manera, dado que las PGPB actúan sobre la planta a través de múltiples mecanismos, transferir mediante ingeniería genética uno solo de estos no proporciona un beneficio significativo a las plantas y por eso se hacen necesarios los inoculantes. Durante el último siglo, las formulaciones de turba se han convertido en efectivos y aceptados portadores, pero su desarrollo casi ha alcanzado el límite. Los portadores sintéticos, los cuales no han sido aún transferidos desde el concepto experimental a inoculantes comerciales, ofrecen mayor potencial y flexibi-

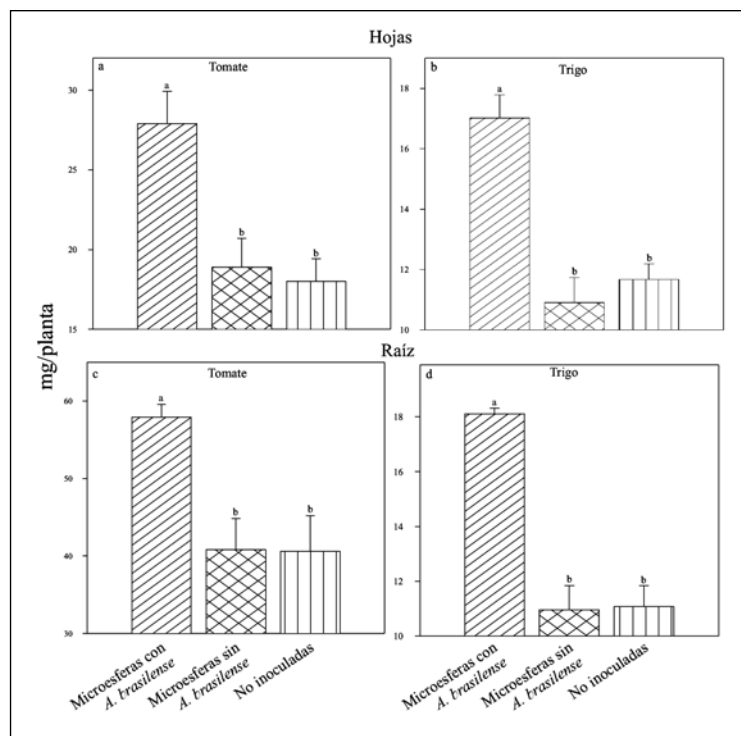


Figura 12.7. (a-d) Efecto de la inoculación con *A. brasilense* en microesferas en el peso seco de hojas y raíces de plántulas de trigo y tomate después de 21 días. Las barras denotadas por letras diferentes difieren significativamente a  $p < 0.05$  según el análisis de varianza de una vía. Las barras de error representan el error estándar.

lidad para la industria de la inoculación. Debido a la escasez de información acerca de nuevos desarrollos de las compañías de inoculantes, es prematuro considerar estos portadores como potencialmente utilizables, aún cuando estos puedan superar muchas de las deficiencias que presentan los inoculantes de turba.

Aunque es cierto que en prácticas agrícolas contemporáneas los inoculantes sintéticos son frecuentemente demasiado costosos (por lo cual las empresas de inoculantes están renuentes a desarrollarlos), la industria de la biorremediación podría sostener el desarrollo de tales inoculantes avanzados. Hasta la fecha se han desarrollado muchos tipos de formas encapsuladas de microorganismos para uso en biorremediación (Cassidy *et al.*, 1996; De-Bashan *et al.*, 2002-2004). Muchos proyectos de biorremediación son apoyados por gobiernos de países en desarrollo o por grandes industrias contaminantes en países desarrollados, los cuales aportan más recursos a la investigación que una organización de productores, de manera que, indudablemente, los inoculantes más eficientes serán usados para procesos de biorremediación, especialmente en emergencias, sin importar su alto costo. Este uso puede proporcionar a la agricultura el desarrollo de nuevos materiales y formulaciones de inoculación. Un uso más amplio de las aplicaciones no agrícolas puede ayudar a que estos materiales sean más competitivos para la agricultura. Bajo una perspectiva realista, debemos aceptar que en el futuro cercano las formulaciones químicas continuarán dominando el mercado. Sólo se espera un aumento gradual y modesto en el uso de inoculantes bacterianos. La agricultura en países desarrollados es definitivamente el mayor promotor de inoculantes microbianos que son amigables con el ambiente. Sin embargo, debe prestarse especial atención a las necesidades y restricciones de los países en desarrollo, que requieren formulaciones de fácil uso y bajo costo. A corto y mediano plazo, se requiere mayor investigación enfocada en el desarrollo de mejores y económicamente más factibles inoculantes sintéticos.

Este ensayo fue escrito en memoria del finado Sr. Avner Bashan de Israel, quien fomentó la investigación en agricultura aplicada. Es financiado por la Semarnat, México (contrato 2002-C01-0005) y la Fundación Bashan, E.U.

## Obras citadas

- Aino M., Y. Maekawa, S. Mayama, H. Kato (1997), "Biocontrol of Bacteria Wilt of Tomato by Producing Seedlings Colonized With Endophytic Antagonistic Pseudomonads", en: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Present Status and Future Prospects. A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.), Hokkaido University, Sapporo, Japón. pp. 120-123.

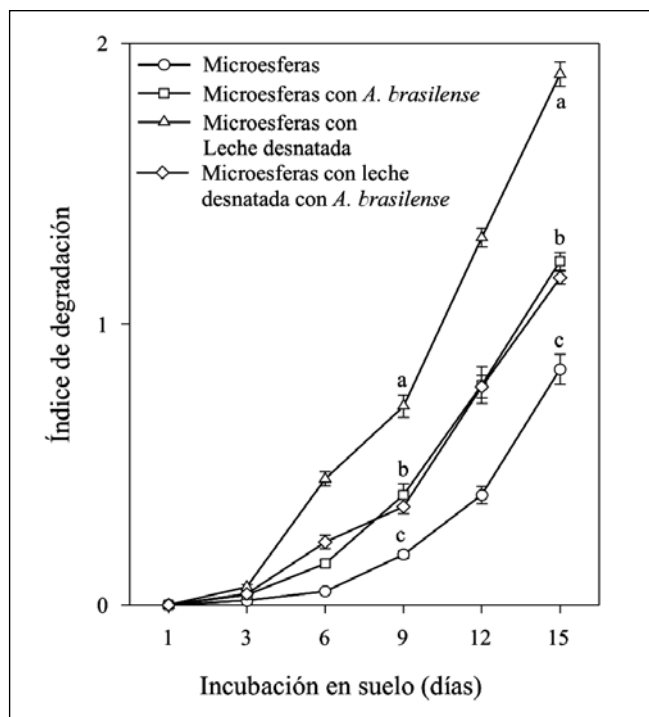


Figura 12.8. Biodegradación a lo largo del tiempo de varios tipos de esferas en suelo pobre. Los datos para cada tiempo denotados con letras distintas difieren significativamente ( $P \leq 0.05$ ) según el análisis de varianza de una vía. Las barras verticales indican el error estándar (0 = microesferas no degradadas, 1 = poca degradación con pequeños huecos y deformaciones en la estructura de la esfera, 2 = completa degradación de la esfera. Datos publicados por Bashan *et al.* (2002).

Bashan Y. (1986), "Alginate Beads As Synthetic Inoculant Carriers for the Slow Release of Bacteria That Affect Plant Growth". *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1089-1098.

\_\_\_\_\_ (1998), "Inoculants of Plant Growth-promoting Bacteria for Use In Agriculture." *Biotechnol. Adv.* 16: 729-770.

\_\_\_\_\_ L. E. González (1999), "Long-Term Survival of the Plant-Growth-Promoting Bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in Dry Alginate Inoculant". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 262-266.

\_\_\_\_\_ J. P. Hernández, L. A. Leyva, M. Bacilio (2002), "Alginate Microbeads As Inoculant Carrier for Plant Growth-Promoting Bacteria". *Biol. Fertil. Soils* 35: 359-368.



- \_\_\_\_\_. H. Levanony, O. Ziv-Vecht (1987), "The Fate of Field-Inoculated *Azospirillum brasilense* Cd in Wheat Rhizosphere During the Growing Season". *Can. J. Microbiol.* 33: 1074-1079.
- Benedict J. H., E. S. Sachs, D. W. Altman, W. R. Deaton, R. J. Kobel, D. R. Ring, S. A. Berberich (1996), "Field Performance of Cottons Expressing Transgenic CryIA Insecticidal Proteins for Resistance to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae)". *J. Econ. Entomol.* 89: 230-238.
- Berge O., J. Fages, D. Mulard, J. Balandreau (1990), "Effects of Inoculation With *Bacillus circulans* and *Azospirillum lipoferum* on Crop-Yield in Field Grown Maize". *Symbiosis* 9: 259-266.
- Briglia M., E. L. Nurmiaho-Lassila, G. Vallini, M. Salkinoja-Salonen (1990), "The Survival of the Pentachlorophenol-Degrading *Rhodococcus chlorophenicus* PCP-1 and *Flavobacterium* sp. In Natural Soil". *Biodegradation* 1: 273-281.
- Brockwell J. (1977), "Application of Legume Seed Inoculants", en: *A Treatise on Dinitrogen Fixation. Section 4. Agronomy and Ecology*. R. W. F. Hardy, AH Gibson (eds.), John Wiley & Sons, Nueva York, pp. 277-309.
- Cassidy M. B., H. Lee, J. T. Trevors (1996), "Environmental Applications of Immobilized Microbial Cells: A Review". *J. Indust. Microbiol.* 16: 79-101.
- De-Bashan L. E., J. P. Hernández, T. Money, Y. Bashan (2004), "Microalgae Growth-Promoting Bacteria As "Helpers" for Microalgae: A Novel Approach for Removing Ammonium and Phosphorus From Municipal Wastewater." *Water Res.* 38: 466-474.
- \_\_\_\_\_, M. Moreno, J. P. Hernández, Y. Bashan (2002), "Removal of Ammonium and Phosphorus Ions From Synthetic Wastewater By the Microalgae *Chlorella vulgaris* Coimmobilized in Alginate Beads With the Microalage Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum brasilense*." *Water Res.* 36: 2941-2948.
- DeLucca A. J., W. J. Connick Jr., D. R. Fravel, J. A. Lewis, J. M. Bland (1990), "The Use of Bacterial Alginates to Prepare Biocontrol Formulations." *J. Indust. Microbiol.* 6: 129-134.
- De Taxis du Pooet P., P. Dhulster, J. N. Barbotin, D. Thomas (1986), "Plasmid Inheritability and Biomass Production: Comparison Between Free and Immobilized Cell Cultures of *Escherichia Coli* BZ18 (pTG201) Without Selection Pressure." *J. Bacteriol.* 165: 871-877.
- Digat B. (1991), "A New Encapsulation Technology for Bacterial Inoculants and Seed Bacterization", en: *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Progress and Prospects*. C. Keel, B. Koller, G. Défago (eds.), IOBC/WPRS Bull, Zurich. pp. 383-391.

- Fages J. (1990), "An Optimized Process for Manufacturing An *Azospirillum* Inoculant for Crops". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 473-478.
- \_\_\_\_\_ (1992), "An Industrial View of *Azospirillum* Inoculants: Formulation and Application Technology". *Symbiosis* 13: 15-26.
- Fravel D. R., J. J. Marois, R. D. Lumsden, W. J. Connick (1985), "Encapsulation of Potential Biocontrol Agents in An Alginate-Clay Matrix." *Phytopathology* 75: 774-777.
- Ganry F., H. G. Diem, Y. R. Dommergues (1982), "Effect of Inoculation With *Glomus Mosseae* on Nitrogen Fixation by Field Grown Soybeans". *Plant Soil* 68: 321-329.
- Jung G., J. Mugnier, H. G. Diem, Y. R. Dommergues (1982), "Polymer-Entrapped *Rhizobium* as An Inoculant for Legumes". *Plant Soil* 65: 219-231.
- Keller E., F. Lingens (1984), "Synthesis of Chorismic Acid by Immobilized Cells of *Enterobacter aerogenes*". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 3-5.
- Kitamikado M., K. Yamaguchi, C. H. Tseng, B. Okabe (1990), "Methods Designed to Detect Alginate-Degrading Bacteria". *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2939-2940.
- Le Tacon F., G. Jung, J. Mugnier, P. Michelot, C. Mauperin (1985), "Efficiency In a Forest Nursery of An Ectomycorrhizal Fungus Inoculum Produced in a Fermentor and Entrapped In Polymeric Gels". *Can. J. Bot.* 63: 1664-1668.
- Lewis J. A., G. C. Papavizas (1985), "Characteristics of Alginate Pellets Formulated With *Trichoderma* and *Gliocladium* and Their Effect on the Proliferation of the Fungi In the Soil". *Plant Pathol.* 34: 571-577.
- Marx D. H., D. S. Kenney (1982), "Production of Ectomycorrhizal Fungus Inoculum", en: *Methods And Principles Of Mycorrhizal Research*. N. C. Schenck (ed.), The American Phytopathological Society. St. Paul, E.U., pp. 131-146.
- Mugnier J., G. Jung (1985), "Survival of Bacteria and Fungi in Relation to Water Activity and the Solvent Properties of Water in Biopolymer Gels". *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 108-I 14.
- Nasri M., S. Sayadi, J. N. Barbotin, D. Thomas (1987), "The Use of the Immobilization of Whole Living Cells to Increase Stability of Recombinant Plasmids in *Escherichia coli*". *J. Biotechnol.* 6: 147-157.
- Neyra C. A., A. Atkinson, O. Olubayi (1995), "Coaggregation of *Azospirillum* With Other, Bacteria: Basis for Functional Diversity", en: *Azospirillum VI and Related Microorganisms, Genetics-Physiology-Ecology*. I. Fendrik, M. del Gallo, J. Vanderleyden, M. de Zamaroczy (eds.), NATO ASI Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlín, Alemania. G37: 429-439.

- Paau A. S. (1988), "Formulations Useful in Applying Beneficial Microorganisms to Seeds". *Trends Biotechnol.* 6: 276-279.
- Paul E., G. Cholez, J. Fages, P. Monsan (1991), "Graines revetues de preparations déshydratées de microorganisms et leur procédé d'obtention". European patent E. P. Núm. 494 802.
- \_\_\_\_\_, J. Fages, P. Blanc, G. Goma, A. Pareilleux (1993), "Survival of Alginate-Entrapped Cells of *Azospirillum lipoferum* During Dehydration and Storage in Relation to Water Properties". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 34-39.
- Perlak F. J., R. W. Deaton, T. A. Armstrong, R. L. Fuchs, S. R. Sims, J. T. Greenplate, D. A. Fishhoff (1990), "Insect Resistant Cotton Plants". *Biotechnology* 8: 945-949.
- Shah-Smith D. A., R. G. Burns (1997), "Shelf-Life of a Biocontrol *Pseudomonas Putida* Applied to Sugar Beet Seeds Using Commercial Coatings". *Biocontrol Sci. Technol.* 7: 65-74.
- Smidsrod O., G. Skjak-Braek (1990), "Alginate as Immobilization Matrix For Cells". *Trends Biotechnol.* 8: 71-78.
- Smith R. S. (1992), "Legume Inoculant Formulation and Application". *Can. J. Microbiol.* 38: 485-492.
- Sougoufara B., H. G. Diem, Y. R. Dommergues (1989), "Response of Field-Grown *Casuarina equisetifolia* to Inoculation With *Frankia* Strain ORS 021001 Entrapped in Alginate Beads". *Plant Soil* 118: 133-137.
- Trevors J. T., J. D. van Elsas, H. Lee, L. S. van Overbeek (1992) "Use of Alginate and Other Carriers for Encapsulation of Microbial Cells for Use in Soil". *Microbial Releases* 1: 61-69.
- Tsuchya K. (1997), "Current Status and Prospects in Research and Practice of Biological Control of Plant Diseases in Japan", en: *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Present Status and Future Prospects*. A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.), Hokkaido University, Sapporo, Japón. pp. 30-35.
- Van Elsas J. D., W. Hekman, L. S. van Overbeek, E. Smit (1991), "Problems and Perspectives of the Applications of Genetically Engineered Microorganisms to Soil". *Trends Soil Sci.* 1: 373-392.
- \_\_\_\_\_, J. T. Trevors, D. Jain, A. C. Wolters, C. E. Heijnen, L. S. van Overbeek (1992), "Survival of, and Colonization by, Alginate-Encapsulated *Pseudomonas fluorescens* Cells Following Introduction Into Soil". *Biol. Fertil. Soils* 14: 14-22.

*La biofertilización como tecnología sostenible*  
se terminó de imprimir en febrero de 2008.  
Tiraje: mil ejemplares.