

Inoculantes microbianos sintéticos: son el futuro para la agricultura?

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

*Grupo de Microbiología Ambiental, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz,
BCS 23090; email: bashan@cibnor.mx*

Nuevas tendencias en las formulaciones, utilizando materiales sintéticos no convencionales diferentes a la tradicional turba.

Durante 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 y protegen a los microorganismos contra estrés ambiental; 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 manipulados fácilmente de acuerdo con las necesidades específicas de las bacterias. Estos inoculantes pueden complementarse con nutrientes 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 en inglés) 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 aun 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 bacteriano. 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 de tiempo.

Los productos bacterianos son entonces extraídos del biorreactor mientras la fermentación continúa. En 1996, Cassidy et al. publicaron una excelente revisión sobre las aplicaciones experimentales de las células microbianas inmovilizadas.

Las células microbianas inmovilizadas son fáciles de producir, almacenar y manejar durante las operaciones industriales. El objetivo fundamental de estas formulaciones industriales es mantener las células atrapadas en una forma activa tanto como sea posible. En general, no es

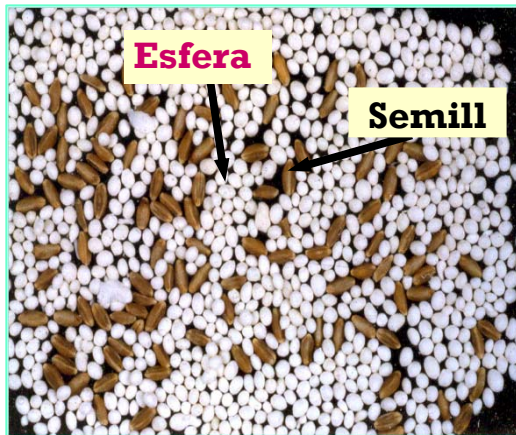


Fig 1 Inoculante de alginato mezclado con semillas de trigo, antes de la siembra

deseable la liberación prematura de los microorganismos de esta forma encapsulada. Las formulaciones de bacterias encapsuladas para usos agrícolas tienen al menos dos objetivos diferentes de aquellas usadas por la industria de fermentación: por una parte, buscan proteger de manera temporal a los microorganismos encapsulados de las condiciones ambientales del suelo y de la competencia microbiana y como segunda medida, buscan liberarlos gradualmente, de manera que colonicen eficientemente las raíces de las plantas.

Micro y macro formulaciones 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. El alginato es un polímero natural compuesto de β -1,4 ácido D-manurónico y ácido L-glucurónico, y puede extraerse de diferentes macroalgas así como de varias bacterias. 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 (Fig. 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. Una vez seca, la preparación puede almacenarse a temperatura ambiente por muchos años.

La producción de microesferas de alginato es simple y se obtienen al rociar la solución de alginato a través de una punta muy fina. Esta tecnología produce esferas de un tamaño de 50 a 200 μm , en las cuales quedan atrapadas un número significativo de bacterias (aprox. 10^8 a 10^9 ufc/g), similar a los valores que se obtienen en macroesferas de alginato. En detalle, Bashan et al, (2002) desarrollaron un método para inocular semillas secas y húmedas con PGPB usando microesferas de alginato como sustrato y *Azospirillum 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 muy 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 μm . Aunque en el proceso mueren parte de las bacterias atrapadas, el número de bacterias sobrevivientes dentro de la microesfera ($> 10^{11}$ ufc/g de esferas) es suficiente para la inoculación de semillas.

Agradecimientos

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, EUA.

Literatura relevante

- Bashan, Y. 1986. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for the slow release of bacteria that affect plant growth. *Applied and Environmental Microbiology* 51: 1089-1098.
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances* 16: 729-770
- Bashan, Y. and 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: 262-266
- Bashan, Y., Hernandez, J.-P., Leyva, L.A. and Bacilio, M. 2002. Alginate microbeads as inoculant carrier for plant growth-promoting bacteria. *Biology and Fertility of Soils* 35: 359-368.
- Bashan, Y., Levanony, H. and Ziv-Vecht, O. 1987. The fate of field-inoculated *Azospirillum brasilense* Cd in wheat rhizosphere during the growing season. *Canadian Journal of Microbiology* 33: 1074-1079.
- Cassidy, M.B., Lee, H. and Trevors, J.T. 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *Journal of Industrial Microbiology* 16: 79-101.
- DeLucca, A.J., Connick, W.J. Jr., Fravel, D.R., Lewis, J.A. and Bland, J.M. 1990. The use of bacterial alginates to prepare biocontrol formulations. *Journal of Industrial Microbiology* 6: 129-134.
- Fages, J. 1990. An optimized process for manufacturing an *Azospirillum* inoculant for crops. *Applied Microbiology and Biotechnology* 32:473-478.
- Fages, J. 1992. An industrial view of *Azospirillum* inoculants: formulation and application technology. *Symbiosis* 13: 15-26.
- Fravel, D.R., Marois, J.J., Lumsden, R.D. and Connick, W.J. 1985. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix. *Phytopathology* 75: 774-777.
- Paau, A.S. 1988. Formulations useful in applying beneficial microorganisms to seeds. *Trends in Biotechnology* 6: 276-279.
- Paul, E., Fages, J., Blanc, P., Goma, G. and Pareilleux, A. 1993. Survival of alginate-entrapped cells of *Azospirillum lipoferum* during dehydration and storage in relation to water properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40: 34-39.
- Smidsrod, O. and Skjak-Braek, G. 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology* 8: 71-78.
- Smith, R.S. 1992. Legume inoculant formulation and application. *Canadian Journal of Microbiology* 38: 485-492.
- Trevors, J.T., van Elsas, J.D., Lee, H. and van Overbeek, L.S. 1992. Use of alginate and other carriers for encapsulation of microbial cells for use in soil. *Microbial Releases* 1: 61-69.