

**Fundación para la Innovación Agraria
FIA**

**PROGRAMA DE FORMACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA**

***APOYO PARA LA PARTICIPACIÓN EN ACTIVIDADES DE
FORMACIÓN***

***17th World Congress of Soil Scienc, Bangkok, Thailand
August 14-21-2002***

INFORME FINAL Código FIA-FP-2002-1-A-35



INFORME DE DIFUSIÓN PROGRAMA FORMACION PARA LA PARTICIPACION

1 Nombre de la propuesta :

Búsqueda de antecedentes y contactos para la futura preparación de biofertilizantes

1.1 Modalidad

Actividad de Formación. Participación en Congreso

1.2 Lugar donde se llevo a cabo la formación

Bangkok, Tailandia

1.3 Rubro / Area temática de la actividad de formación

Rubro: Fertilidad de suelos y nutrición mineral de plantas

Area: Agricultura orgánica y sustentable

1.4 Fecha en la que se efectuó la actividad de formación:

14-21 Agosto 2002

1.5 Postulante

Fernando Borie B.-

1.6 Entidad Responsable

Universidad de La Frontera

1.7 Coordinador

2

2. ACTIVIDADES DE TRASFERENCIA

2.1. Resumen actividades de transferencia PROPUESTAS

FECHA	ACTIVIDAD	OBJETIVO	LUGAR	Nº y TIPO BENEFICIARIOS
Sept. 2002t	Presentación oral a miembros Asoc. Agricultura Orgánica del Surores	Duscutir las potencialidades y aplicación de los biofertilizantes	Fac. Ciencias Agropecuarias y Forestales- UFRO	15 Agricultores y profesionales del área
Oct 2002	Articulo a publicar en Frontera Agrícola	Difundir las potencialidades de los biofertilizantese		Indeterminado: existe revista interbibliotecario
Oct 2002	Reunión de trabajo con técnicos y profesionales del CET-Temuco	Discusión de los resultados del proyecto en lo pertinente a Agricultura orgánica	UFRO	4 profesionales

2.1. Resumen actividades de trasferencia REALIZADAS

FECHA	ACTIVIDAD	OBJETIVO	LUGAR	Nº y TIPO BENEFICIARIOS
Nbre.2002	Charla a agricultores y profesionales	Difundir potencialidades de los biofertilizantes	Auditorio Agroindustria Inst.	27 Agricultores, profesionales y técnicos del rubro agrícola.
Nbre 2002	Charla a estudiantes	Presentación del trabajo	Auditorio Inst.	17 estudiantes de



		presentado en Tailandia	Agroindustria	pre y postgrado
Dcbre 2002	Artículo a publicar en Frontera Agrícola	Difundir potencialidades de biofertilizantes	Escrito	Indeterminado

2.2. Detalle por actividad de transferencia **REALIZADAS**

Fecha: 19 Noviembre de 2002.

Lugar (Ciudad e Institución) Instituto de Agroindustria, Universidad de La Frontera-
Temuco_____

Actividad (en este punto explicar con detalle la actividad realizada y mencionar la información entregada)_Se hizo una charla a agricultores y profesionales que laboran en las empresas de fertilizantes y en labores de extensión , la cual tuvo una duración aproximada de 60 min. y versó sobre los tipos de microorganismos utilizados en la formulación de biofertilizantes sean éstos solos o en asociación con otros microorganismos. La información entregada incluyó los principales microorganismos involucrados, las matrices o carriers utilizados habitualmente, con especial énfasis en los tipos microencapsulados. Especial énfasis se colocó en los tipos de agricultura donde se hace posible el uso de este tipo de fertilizantes.

Fecha_21 de Noviembre de 2002_____

Lugar (Ciudad e Institución) Instituto de Agroindustria, Universidad de La Frontera-
Temuco_____

Actividad (en este punto explicar con detalle la actividad realizada y mencionar la información entregada).Charla dirigida a estudiantes de los últimos cursos de la Carrera de Agronomía, con una duración de aproximadamente 50-60 min. en la cual también estuvieron presentes los estudiantes del Programa de Doctorado en Ciencias de los Recursos Naturales. La charla consistió en la exposición del trabajo presentado al 17 Congreso Internacional de la Ciencia del Suelo, Bangkok, Tailandia, y los alcances recibidos al mismo. También se plantearon los efectos de la adición de tipos de fertilizantes fosfatados al suelo sobre los propágulos de hongos MA así como también el efecto sobre los parámetros micorrícicos en relación a la calidad y cantidad de materia orgánica agregada al suelo. .

Fecha Diciembre 2002_____

Lugar (Ciudad e Institución) _Instituto de Agroindustria, Universidad de La Frontera,
Temuco_____

Actividad (en este punto explicar con detalle la actividad realizada y mencionar la información
entregada)_Escrito en la Revista Frontera Agrícola "Potencialidades de los biofertilizantes"_(Se
adjunta escrito)_____

Fecha_____

Lugar (Ciudad e Institución) _____

Actividad (en este punto explicar con detalle la actividad realizada y mencionar la información
entregada)_____

2.2. Especificar el grado de éxito de las actividades propuestas, dando razones de los problemas presentados y sugerencias para mejorar.

Noviembre y Diciembre son fechas que a los agricultores los tiene muy atareados en las labores de campo, de allí que el grado de adhesión a esta actividad, no siendo mala, pudiera haber sido mejor la asistencia, en otra ocasión.

En la semana anterior se hizo el lanzamiento de un libro de Cero Labranza, de Don Carlos Crovetto, tema que generalmente atrae a muchos agricultores, técnicos y estudiantes. Aunque se cursaron alrededor de 150 invitaciones, tan sólo llegaron a dicha actividad alrededor de 30.



2.3. Listado de documentos o materiales mostrados en las actividades y entregados a los asistentes (escrito y/o visual). (Se debe adjuntar una copia del material)

Tipo de material	Nombre o identificación	Idioma	Cantidad
Presentación PowerPoint	Potencialidades de los Biofertilizantes	Español	1

Presentación en Powerpoint	Fertilización nitrogenada en trigo y propágulos de micorrizas arbuscularesV	Español	1
Trabajo Escrito	Potencialidades de los Biofertilizanteses	Español	1

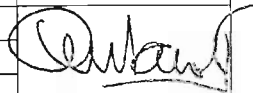
3. ASPECTOS ADMINISTRATIVOS

Indicar los problemas administrativos que surgieron en la preparación y realización de las actividades de difusión.

Fecha: 4 Diciembre 2002 _____

Firma responsable de la ejecución: Fernando J. J. J.

ASISTENTES A ACTIVIDAD DE DIFUSIÓN

Nombre	Actividad Principal	Institución o Empresa	Teléfono Fax e-mail	Firma
Juane Santodon		Sofo	403 100	
Juan Delgado Roldan		Indop Pituque	3910 69	
Juan R. Delgado Roldan		Reapertura Rielche	7336 66	
Ricardo Ruiz	Estudiante	UFRO.	09-674 9538 ruizrm@upw.cl	
Jonathan Redel	✓	✓	4061 73 redely@upw.cl	
Andres Salinas P.		Indop. Garba	491800 salpalma@hotmail.cl	
Andres Vera		SG 2000 Ltda	741020 ver2000@sewnet.cl	
Howard Lange	Estudiante	UFRO.	318748 lange H@upw.cl	
Luis Rallo		Indop T. Schmidt.	664037	



Abel Killeben		Judop T. Schmidt	664037	
Andreas Träebuch		Solo.	403100	
Claudio Restillo	Post grado	UFRO.	731455	
Martin Ramirez	Ingeniero Agronomo	Paragill	09-7990034	
Tomando Rowe		UFRO	325430	
Gonzalo Herrera	Ingeniero Agronomo	Paragill	749345 Oficina	
Edith Planteau		UFRO.		
Walter Lopez.		UFRO.	325055	
Angelica Plasman.		UFRO.	325493	
Goetz Palfner		U de Sheffield		

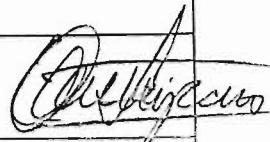
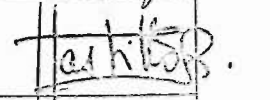
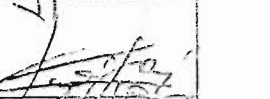
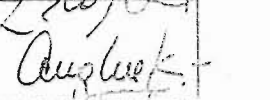
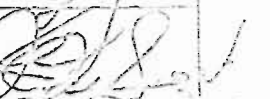


Victor Yang	Ingeniero Agronomo	SQ N.	210702 lyang@sqn.cl	
Leonardo Gaxiola	Ingeniero Agronomo	S.Q.N.	210702 lgaxiola@sqn.cl	
Paola Sobarzo	Ing. Agronomo	.	284228/99202967 ppadosh@yahoo.com	
Taliana Floosky	Lab. Químico	UFRO	325494 tfloosky@yahoo.es	
Victoria Campos G.	Químico Laboratorista	UFRO.	643998	
Brigida Sobarzo B.	Químico analista	UFRO	325494	
Noelia Sepúlveda	Químico Laboratorista	UFRO	325456	
Jorge Pina Morandio	Ingeniero en Alimentos	UFRO	311352	

ASISTENTES A ACTIVIDAD DE DIFUSIÓN

Nombre	Actividad Principal	Institución o Empresa	Teléfono Fax e-mail	Firma
Paula Rentería Zúñiga		UFRO	pcortes@ufro.cl	
Patricia Vistoso	Estudiante Doctorado	UFRO	E. VISTOSO@UFRO.CL	
María Perea	Estudiante Doctorado	UFRO	mpera@ufro.cl	
Amaly Zozas	Estudiante	UFRO	amaly.zozas@ufro.cl	
Pablo Pariqueo	Estudiante	INACAP	65 2201	
Juan Poblete A.	Estudiante	Inacap.	612241	
Caroline Ordóñez J.	Estudiante	UFRO	405854	
ARMANDO HERA SÁEZ	ESTUDIANTE	UFRO	8366583	
Christian Neumann	Estudiante	UFRO	295796	

ASISTENTES A ACTIVIDAD DE DIFUSIÓN

Nombre	Actividad Principal	Institución o Empresa	Teléfono Fax e-mail	Firma
KARINA Quiroga		UFRO	KARINA.Q@UFRO.CL	
Claudia Castillo		UFRO	731455	
Rotana López		UFRO	Lopez R@ufro.cl	
Angélica Coronado		UFRO	mcoranov@ufro.cl	
HOWARD LANGER		UFRO	Langerh@ufro.cl	
CRISTINA KUDOR		UFRO	KUDORZ@UFRO.CL	
Yonathan Redel		UFRO	redely@ufro.cl	
Zeidoreth Umurina		UFRO		

***ARTICULO ENVIADO AL COMITÉ EDITOR DE LA
REVISTA TÉCNICA FRONTERA AGRÍCOLA***

POTENCIALIDADES DE LOS BIOFERTILIZANTES

Fernando Borie B. Universidad de La Frontera.

Los biofertilizantes pueden ser definidos como “productos formulados a partir de microorganismos del suelo que tienen la capacidad de aumentar la concentración de nutrientes solubles en la rizósfera, aumentando su captación por las raíces y, por tanto, beneficiando el crecimiento y desarrollo vegetal”.

A la luz de tal definición resaltan algunos conceptos que se hace necesario enfatizar como es el caso de nutrientes, microorganismos del suelo y rizósfera. Así, mientras toda planta necesita al menos de 17 elementos como nutrientes, en diferentes cantidades, los más fundamentales son el Nitrógeno (N), Fósforo (P) y Azufre (S) siendo los dos primeros los más universales y de allí que los biofertilizantes más comunes están asociados a estos dos elementos. Adicionalmente, los microorganismos del suelo, del orden de cientos de miles a cientos de millones por gramo de suelo, se encuentran en mayor cantidad asociados a las raíces puesto que se nutren de las secreciones de éstas, ricas en carbono, sustancias tales como ácidos orgánicos, proteínas y carbohidratos. A esta zona alrededor de las raíces donde la actividad microbiana es alta se le conoce como rizósfera.

Existen numerosos microorganismos que pueden ser utilizados como biofertilizantes, siendo los más comunes los del ciclo del N, P y S, siendo añadidos al suelo bajo diferentes formas, algunas de las cuales toman el nombre genérico de inoculación, que consiste en la aplicación directa o en la semilla de millones de microorganismos que son beneficiosos al cultivo. Algunos tipos de microorganismos se observan en Tabla 1.

Tabla 1: Tipos de microorganismos más comunes utilizados en la formulación de biofertilizantes

Microorganismos ciclo N	Microorganismos ciclo P	Microorganismos ciclo S
Fijadores de N <i>Rhizobium</i> <i>Azotobacter</i> <i>Azospirillum</i>	Solubilizadores de P <i>Fosfohongos y fosfobacterias</i> <i>Micorrizas VA y ECM</i>	Oxidantes del S <i>Thiobacillus thiooxidans</i> Reductores del S <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>

A continuación se abundará un tanto sobre cada uno de estos tipos para, posteriormente, describir las formas como éstos son aplicados al suelo.

Fijadores de N

Desde muy antiguo se conoce que existe un tipo de microorganismos que posee la capacidad de formar nódulos en las raíces de las leguminosas los cuales son conocidos como bacterias de la especie *Rhizobium*, las cuales pueden vivir simbióticamente en las

raíces de sus hospederos pudiendo fijar cantidades importantes de N atmosférico (50-300 kg N/ha). Las primeras fábricas de inoculantes se establecieron en Alemania a comienzos del siglo pasado, siendo las primeras en utilizar turba como material inerte.

Otros bacterias fijadores de N típicas de suelos tropicales y subtropicales son especies de género *Azotobacter* y *Azospirillum*, las cuales son capaces de colonizar raíces de cereales y gramíneas produciendo un incremento en rendimientos del orden de 10-30%. Todas estas bacterias fijadoras de N tienen un alto costo energético por lo que necesitan de altas concentraciones de P siendo muy dependientes de este nutriente toda vez que se calcula que, teóricamente, se necesitan al menos 28 moles de ATP para fijar un mol de N atmosférico (Neves et al., 1992). De allí que siempre las leguminosas son altamente dependientes del P de los suelos.

Solubilizadores y mineralizadores de Fósforo

Dependiendo si son bacterias u hongos se les ha dado por llamar fosfobacterias y fosfohongos, respectivamente. Cuando la solubilización se produce a partir de fosfatos inorgánicos, por ej. fosfatos de Ca, de Fe o de Al e incluso tipos de apatitas, el proceso se le conoce como solubilización de fosfato. Por el contrario, cuando la solubilización es a partir de fosfatos orgánicos del tipo inositolfosfatos de Ca, Fe, Al, el proceso se llama mineralización. Existen en el suelo, desde donde se pueden aislar y multiplicar en medios de cultivos artificiales, una serie de especies de bacterias, hongos y actinomicetes que son capaces de solubilizar o mineralizar fosfatos insolubles del tipo que habitualmente se encuentran en los suelos. Entre las bacterias se menciona exitosamente la actividad de varias especies como *Bacillus*, *Thiobacillus*, *Pseudomonas*, etc, siendo *Bacillus megaterium* var *phosphaticum* uno de los más efectivos (Muit Sai y Rossetto, 1992). Por otra parte, en suelos ácidos parecieran ser los hongos más efectivos que las bacterias, dentro de los cuales se mencionan especies fúngicas del tipo *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, etc. (Whitelaw, 2000; Richardson, 2001).

En suelos del Sur de Chile se ha encontrado una amplia gama de solubilizadores de fosfatos, sean éstas bacterias u hongos destacando el suelo Osorno donde se encontró que su población microbiana, tanto hongos como bacterias, representaban más del 50% con capacidad de solubilizar fosfato de calcio (Borie et al., 1983). En el mismo estudio, estos autores encontraron que de las especies con capacidad solubilizadora destacaba *Aspergillus*, concluyendo que si bien dicha población está cumpliendo un rol en ese medio en cuanto a la solubilización de fosfatos, dicho rol se puede exacerbar sea mediante entregar al suelo las condiciones para que esa microflora se incremente o mediante la inoculación de las mismas cepas, aumentando el potencial microbiano de ese suelo (Borie et al., 1983). Dado que los suelos volcánicos del sur del país poseen una gran cantidad de P bajo formas insolubles, producto de la acumulación por las sucesivas fertilizaciones, del estudio anterior se desprende que la inoculación al suelo de hongos del tipo *Aspergillus* podría movilizar significativas cantidades de P que pudieran ser aprovechadas por la planta.

Muy interesantes y pioneros han sido los experimentos de Kucey et al (1988) con el fosfohongo *Penicillium bilajii* sobre roca fosfórica en suelos donde la inoculación con dicho fosfohongo, al solubilizar la roca, prácticamente produjo un efecto similar de un

Oxidantes y reductores de Azufre

Thiobacillus thiooxidans es capaz de utilizar azufre como fuente energética para su crecimiento y metabolismo, liberando ácido sulfúrico como producto de la reacción. Dicho ácido fuerte es capaz de solubilizar formas insolubles de fosfato. Esto ocurre fundamentalmente en suelos tropicales o subtropicales siendo escaso el efecto en suelos templados debido a la limitada población de tales bacterias. Lo anterior ha sido motivo para la preparación de un biofertilizante, denominado comercialmente BIOSUPER, que combina azufre en polvo, *Thiobacillus* y fosfato de roca; así mientras *Thiobacillus* utiliza el azufre y produce ácido sulfúrico, éste solubiliza a su vez al fosfato de roca, siendo por tanto un fertilizante de entrega lenta.

De otra parte, *Desulfovibrio desulfuricans*, bacteria que produce ácido sulfhídrico (H_2S) en condiciones de anaerobiosis, puede ser capaz de desplazar al fosfato ligado a Fe formando Fe_2S_3 , muy insoluble, dejando fosfato soluble para el cultivo. Lo anterior ocurre en ocasiones en condiciones de anaerobiosis, en el cultivo de arroz bajo condiciones de anegamiento.

Matrices utilizadas como biofertilizantes

Existen materiales que pueden ser utilizados como soportes o *carriers* en la producción de inoculantes que pueden ser utilizados como biofertilizantes. Tal es el caso de la turba utilizada para preparar inoculantes de *Rhizobium*. Otros soportes utilizados habitualmente consisten en vermiculita o perlita; arcillas expandidas natural o artificialmente, donde en sus poros se adhieren esporas o hifas de hongos; subproductos forestales, como aserrín o corteza de árboles, productos que por su alta relación C/N tienen la desventaja de inmovilizar N aplicado como fertilizante; compost; etc. Sin embargo, lo más actual y novedoso consiste en la formación de cápsulas gelatinosas de alginato de calcio, donde el microorganismo queda atrapado al interior de una cápsula, al hacer incidir gotas de cloruro de calcio sobre una solución de alginato de sodio que tiene suspendido el microorganismo a encapsular. Al juntar ambas soluciones se genera una esfera, de diferente tamaño dependiendo del tamaño de la gota de cloruro de calcio que contiene en su interior al microorganismo. Dichas esferas, fáciles de transportar y almacenar, una vez que se adicionan al suelo, son descompuestas en el lapso de pocos días, quedando el microorganismo en condiciones de colonizar la raíz o el suelo alrededor de ésta. Existen todo tipo de esferas, macro o microesferas producidas por goteo o aspersión de la sal cálcica sobre el alginato (Fig. 2).

Potencialidad en los diferentes tipos de agricultura

Tal como se mencionara anteriormente, los biofertilizantes asociados al ciclo del N y P son los más utilizados, puesto que pueden reemplazar, en parte, la utilización de fertilizantes que producen polución. Así, mientras el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados conlleva la pérdida de nitratos por lixiviación, contaminando aguas superficiales y subterráneas, fosfato por su parte, es perdido por erosión causando eutroficación de lagos y ojos de agua. Por otra parte, es sabido que las reservas de P en la corteza terrestre no alcanza para más allá de 200 años al ritmo de utilización actual. De allí

que es importante el uso de microorganismos para ciclar tales nutrientes, sea desde la atmósfera, en caso de la fijación biológica de N o aprovechar el ciclado del P fijado en los suelos.

En este contexto, aunque *Rhizobium* se lo ha utilizado durante todo el Siglo XX, vale decir casi 100 años de experiencia (Brockwell et al., 1995), la mayor parte del inoculante producido a nivel mundial actualmente es de poca calidad (Olsen et al., 1995). Los inoculantes más utilizados son los que conllevan el uso de varias cepas, siendo mucho más efectivos que aquéllos en base a una sola cepa (Paau, 1989). La doble inoculación de *Rhizobium* con otros microorganismos o también llamada coinoculación ha tenido amplia aplicación, sean éstos hongos MA, hongos solubilizadores de P, etc (Barea et y Azcón, 1983; Thiagarajan et al., 1992).

Aunque la utilización de todos estos microorganismos tiene una amplia utilización en la llamada agricultura sustentable es en los sistemas de agricultura orgánica donde puede tener su máxima expresión. Así, dado que en este tipo de agricultura no se utilizan fertilizantes químicos nitrogenados y se hace uso de leguminosas o compost en base a leguminosas, la aplicación de biofertilizantes del tipo *Rhizobium* para este tipo de cultivos o *Azospirillum* para cereales son estrategias de gran potencialidad. Del mismo modo, aunque se puede utilizar fosfatos de roca, el uso de fosfobacterias en conjunción o no con hongos MA podrían ser de manifiesta utilidad en aquellas situaciones donde se favorece la producción limpia de alimentos, vale decir, donde prevalecen más los criterios de calidad que de cantidad. No obstante, la preparación de biofertilizantes en base a microencapsulados de alginato es una tecnología que pareciera ser de mucha potencialidad para cubrir amplios espectros de situaciones donde el uso de fertilizantes químicos no son la prioridad.

Referencias

- Barea, J.M y Azcón-Aguilar C. 1983. Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. Adv. Agron. 36: 1-54.
- Brockwell J., Bottomley, P.J y J.E.Thies. 1995. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: A critical assesment. Plant and Soil 174: 143-180.
- Borie F., J.Quinteros y M.Aguilera. 1983. Bioquímica de suelos derivados de cenizas volcánicas. IV. Solubilización de fosfatos por hongos del suelo. Agric. Tecn. 43: 371-376.
- Kucey, R.M.N. 1988. Effect of *Penicillium bilaji* on teh solubility and uptake of P and micronutrients from soils by wheat. Can J. Soil Sci. 68: 261-270.
- Liu Mui Tsai y R. Rossetto. 1992. Transformacoes microbianas do fosforo. En : Microbiologia do Solo. E. Cardoso, S.M.Tsai (Eds.) Soc. Bras. Ciencias do Solo, p. 231-255.

Neves M.C. 1992. Bioquímica e Fisiologia de fixação de nitrogênio. En: Microbiologia do Solo. Microbiologia do Solo. E. Cardoso, S.M.Tsai (Eds.) Soc. Bras. Ciências do Solo, p. 141-145.

Olsen P.E., Rice W.A y Collins M.M. 1995. Biological contaminants In North American rhizobial legume inoculants. Soil Biol Biochem 27:

Paa, A.S. 1991. Improvements of *Rhizobium* inoculants. Appl. Environ. Microbiol. 55:862-865.

Richardson A.E. 2001. Prospects for using microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. Aust. J. Plant Physiol. 28:897-906.

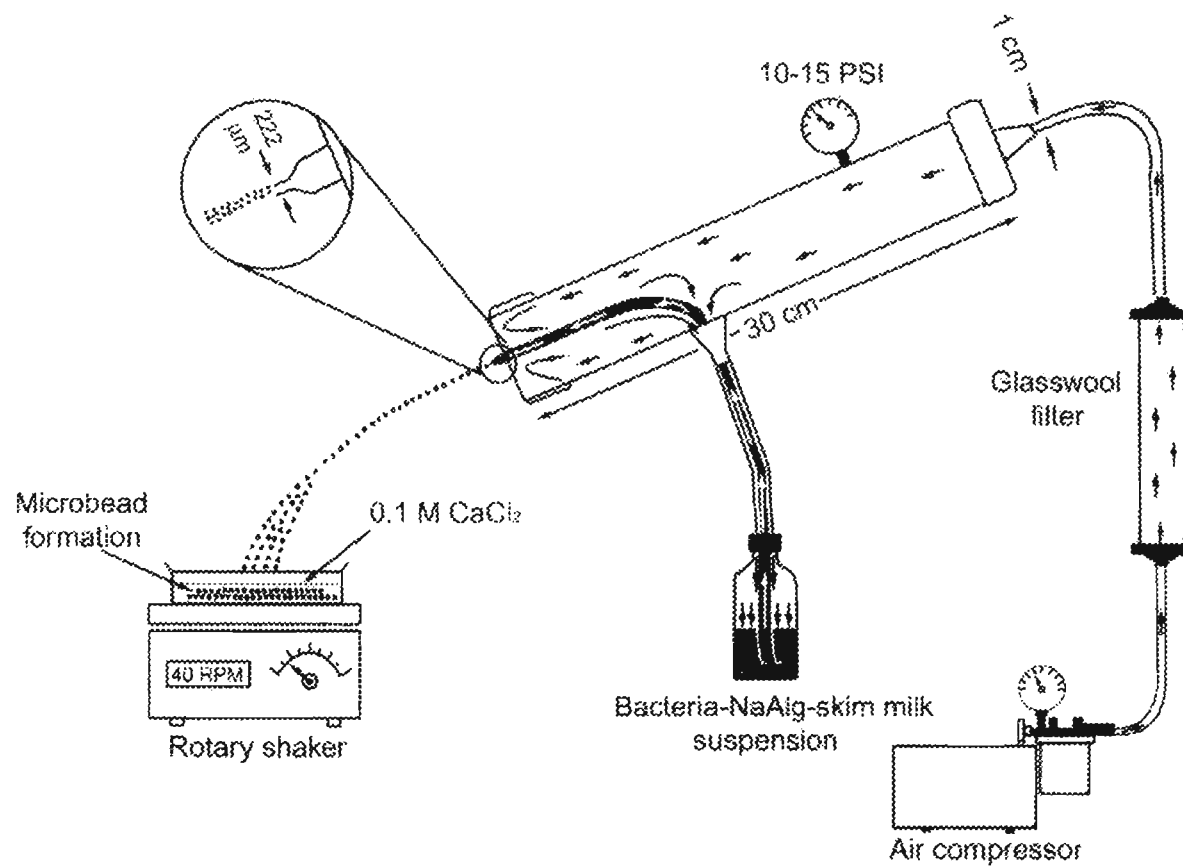
Thiagarajan T.R., Ames R.N. y Ahmed M.H. 1992. Response of cowpea to inoculation with co-selected vesicular arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* strains in field trials. Can. J. Microbiol. 38:573-576.

Whitelaw M.A. 2000. Growth promotion of plants inoculated with *Penicillium radicum* Soil Biol. Biochem. 31: 655-665.



FIG. 1-

Fig. 2 Equipment for the production of microbeads. The original drawing is reproduced from Carrillo and Bashan (1997), by permission of the publisher



INFORME TÉCNICO
CÓDIGO FV-2002-1-A-35

CONTENIDO DEL INFORME TÉCNICO

PROGRAMA DE FORMACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

1. Antecedentes Generales de la Propuesta

Nombre: Fernando Borie B.

Código FP-V-2002-1-A-35

Entidad Responsable Postulante Individual: Universidad de la Frontera

Coordinador

Lugar de Formación (País, Región, Ciudad, Localidad): Bangkok, Tailandia

Tipo o modalidad de Formación: Participación en 17th International Congress of Soil Science

Fecha de realización: 14-21 Agosto de 2002

Participantes: presentación de acuerdo al siguiente cuadro:

Nombre	Institución/Empresa	Cargo/Actividad	Tipo Productor (si corresponde)
Fernando Borie B	Univ. de La Frontera	Profesor-Investigador	

Problema a Resolver: detallar brevemente el problema que se pretendía resolver con la participación en la actividad de formación, a nivel local, regional y/o nacional.

Parte de la agricultura de la IX Región y por impulso de políticas del Gobierno Regional está derivando en prácticas de agricultura orgánica, adaptada a pequeños agricultores que verían mejoradas sus expectativas económicas de producción, toda vez que se está incrementando la demanda de productos de este tipo (principalmente fruta y productos hortícolas) y lo es más aún en las actuales circunstancias tras la firma del acuerdo comercial con la Unión Europea. La producción de biofertilizantes apunta en la dirección correcta en términos de producción primaria limpia, sin la aplicación de fertilizantes químicos tradicionales, los cuales están impedidos de utilizarse en este tipo de agricultura, a excepción de los fosfatos de roca, los que con la aplicación de biofertilizantes preparados a partir de microorganismos solubilizadores de fosfato pueden aportar la cantidad de P necesario para el cultivo del vegetal.



Objetivos de la Propuesta

2. Antecedentes Generales

La actividad de formación desarrollada tenía como objetivo la captura de información sobre la preparación y uso de biofertilizantes en sistemas agrícolas de producción limpia o de agricultura sustentable. Se presentaron diferentes trabajos cuyo objetivo era demostrar, bajo diferentes sistemas, el beneficio del uso de microorganismos sea en el mejor aprovechamiento de nutrientes o en disminuir ciertos tipos de toxicidades. A continuación se hará una breve descripción de los sistemas más recurrentes en este Congreso.

a) *Uso de biofertilizantes en la adquisición de N atmosférico por plantas arbóreas.*

Un trabajo que resultó interesante fue la aplicación simultánea de inoculación de *Rhizobium* y fertilizantes nitrogenados en *Leucaena*. Los resultados permitieron concluir que:

- Fertilizantes nitrogenados en dosis bajas combinadas con la inoculación con *Rhizobium* incrementaron en más de un 60% la materia seca de hojas y ramas, comparados con el control no inoculado.
- La inoculación en presencia o ausencia de N fertilizante aumentó en un 66% el peso seco de hojas.
- La inoculación con *Rhizobium* trajo aparejado un incremento del K y P foliar y cuando dicha inoculación se realizó en presencia de fertilizantes nitrogenados también se observó un incremento en la concentración de micronutrientes.

Otro trabajo que destacó también fue el mejoramiento de la eficiencia en la captación de N atmosférico por parte de cepas de *Rhizobium* genéticamente modificadas de modo e incrementar la captación de N con menor pérdida de energía, que es un tipo de investigación realizada en muchos laboratorios tendientes a lograr cepas más efectivas.

b) *Ventajas de la aplicación de Azospirillum*

La introducción de microorganismos promotores del crecimiento en la zona rizosférica de plantas produce un aumento de la productividad vegetal conjuntamente con una minimización de la carga de agroquímicos en los suelos. Se observó el efecto beneficioso de la inoculación de *Azospirillum brasilense* en el crecimiento y nutrición de cebada y trigo conjuntamente con una disminución de agentes contaminantes.

Sin embargo, el trabajo con esta bacteria que resultó muy interesante y novedoso fue la aplicación de cepas de *Azospirillum* sólo o en conjunción con fertilizantes nitrogenados sobre el crecimiento y nutrición del crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*). Los resultados obtenidos señalan que la inoculación con *Azospirillum*

sp incrementaron significativamente los parámetros de rendimiento (35 ton/ha) y adquisición de nutrientes. Este estudio concluye que la inoculación de *Azospirillum* en crisantemo puede sustituir hasta el 25% del N aplicado como fertilizante reduciendo sus inputs y sus efectos deletéreos sobre el medio ambiente.

c) *Uso de microorganismos del ciclo del fósforo*

La mayor parte de los trabajos estuvieron dedicados a poner en evidencia la capacidad de los hongos de las micorrizas de beneficiar a la planta hospedera tanto en su crecimiento, nutrición, carácter detoxificador, frente a estreses bióticos como abióticos etc. , siendo inoculados solos o en combinación con fertilizantes fosfatados. Se presentaron trabajos en endo y ectomicorrizas. . Desde el punto de vista de nuestra realidad, un trabajo que resultó ser interesante fue en plantas ornamentales destacando el efecto de la inoculación de hongos MA sobre todos los parámetros de crecimiento y nutrición de plantas de crisantemo siendo de suma importancia el acortamiento del tiempo de floración.

Interesantes trabajos se presentaron también relacionados con la interacción conjunta de bacterias fijadoras de N , junto a bacterias solubilizadoras de P o asociadas a micorrizas y *thioabacillus*.

En síntesis, la información lograda tras la asistencia y participación en este Congreso permite extraer como resultado la necesidad de investigar con más profundidad la aplicación de estos tipos de microorganismos en pos de lograr beneficios sustantivos en cuanto a la disminución de fertilizantes y agroquímicos en la producción sea de alimentos o plantas ornamentales, rubros ambos que son pertinentes a nuestra Región.

3. Itinerario Realizado: presentación de acuerdo al siguiente cuadro:

Fecha	Actividad	Objetivo	Lugar
17 Agosto de 2002	Presentación del trabajo " Influence of nitrogen forms on wheat mineral acquisition and mycorrhizal propagules released	Exponer los resultados de parte de nuestra línea de investigación que dice relación con el efecto de los fertilizantes sobre los propágulos de hongos MA.	Queen Sirikit National Convention Center- Bangkok, Thailandj
14-21 Agosto de 2002	Participación en los diferentes symposia del Congreso Mundial de las Ciencias del Suelo e intercambiar información con científicos del área.	Capturar información sobre el uso de microorganismos en reemplazo de algunos fertilizantes conjuntamente con informarse sobre actividades relacionadas con agricultura orgánica y microorganismos	Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand.

Señalar las razones por las cuales algunas de las actividades programadas no se realizaron o se modificaron.

4. Resultados Obtenidos

De los numerosos trabajos presentados en el Congreso que decían relación con el uso de microorganismos como biofertilizantes propiamente tales ninguno estaba relacionado con el uso de alginato de calcio como carrier para la fabricación de esferas donde se lleva incluido el microorganismo, el que se va liberando paulatinamente en la medida en que el alginato es descompuesto o degradado, tanto por los microbios de su interior (el inóculo) como aquéllos propios de la rizósfera.

Hasta ahora, pareciera ser que la mayoría de los biofertilizantes comerciales están formulados a base de turbas de modo de pelletizar semillas. Si bien éstas se han y siguen utilizándose en la inoculación de *Rhizobium* y similares ya se ha alcanzado su límite tecnológico para hacerlos más eficientes. Poseen serias dificultades cual es la naturaleza de la turba y la poca disponibilidad de ésta en algunas regiones del mundo. Durante la última década se han formulado una serie de preparados experimentales, en base a polímeros y que han demostrado tener una serie de ventajas prácticas sobre la turba.

Dichas formulaciones encapsulan las células vivas, protegen a los microorganismos de los estreses ambientales liberándose gradualmente su contenido a medida que son degradados en el suelo, pueden también ser almacenados a temperatura ambiente por períodos prolongados, permiten ser cuantificados de mejor manera al ser aplicados al suelo pudiendo confiarse en la repetibilidad de los resultados y pueden ser mejor manipulados de acuerdo a las necesidades del microorganismo que encierran y de acuerdo a la planta sobre la cual se van a aplicar. Del mismo modo, se puede incluir en la matriz algunos nutrientes para una mejor adaptación del microorganismo al entorno al cual va a beneficiar. Sin embargo, a pesar de tales ventajas son más caros de utilizar y por tanto el cultivo sobre el cual se aplique debe ser lo suficientemente rentable como para asegurar márgenes de utilidad que estén acordes con su uso.

Alginate es el material polimérico más comúnmente utilizado en la encapsulación de microorganismos para propósitos microbiológicos industriales aunque también se ha utilizado otros polisacáridos provenientes de algas.

Un trabajo relevante es el recientemente publicado por Bashan et al en Biol. and Fertility of Soils y el cual se anexa aquí. Sus resultados permiten concluir que la preparación de estos biofertilizantes en base a alginatos y su aplicación a los suelos de la Región que son deficitarios en P disponible puede ser realidad en el mediano y el cual es un tema que se está profundizando en nuestro grupo de investigación.

5. Aplicabilidad

Los conocimientos adquiridos en el marco del Congreso y el intercambio de opiniones con algunos investigadores asistentes, en especial de países no industrializados, permite suponer que es posible la aplicación de estas tecnologías en algunas situaciones, tal como es el caso de la agricultura orgánica. Si se pusiera a punto la metodología de preparación de esferas matriciales de alginato de calcio permitiría la incorporación de otros ingredientes a tales matrices como los son hormonas, biocidas de entrega lenta, etc. vale decir, esta tecnología de preparación de matrices abriría un abanico de posibilidades de aplicación insospechadas en el campo de la producción agrícola y forestal, no tan sólo ligada a la agricultura de esta Región.).

6. Contactos Establecidos: presentación de acuerdo al siguiente cuadro:

Institución/Empresa	Persona de Contacto	Cargo/Actividad	Fono/Fax	Dirección	E-mail
Institut National de la Recherche Scientifique. INRA, France	Phillipe Hinsinger	Investigador INRA Departement Science du Sol		Place Viala 34060, Montpellier Cedex 1.France	
CSIRO Plant Industry Australia	Hens Maartens	Investigador		GPO Box 1600, Canberra ACT 2601, Australia	
CSIRO Plant Industry, Australia	George TIM	Investigador		GPO 16000, Canberra ACT 2601, Australia	
Institute of Biotechnology, Chonnam National University	Kim Kil Yong	Investigador		Kwangju 500-757- Korea	

7. Detección de nuevas oportunidades y aspectos que quedan por abordar

Durante el Congreso se hicieron contactos científicos relacionados con la problemática del P en suelos deficitarios pudiendo, en un futuro cercano, y en espera de lograr un financiamiento adecuado, lograr un fluido intercambio científico.

8. Resultados adicionales

Los resultados de la interacción científica con los asistentes contactados: será posible verla materializada más adelante, en convenios que aún no se visualiza su fuente de financiamiento pero es sabido que los convenios con los países de la Comunidad Europea empezarán a ser realidad en un futuro no tan lejano.



9. Material Recopilado

Se adjunta fotocopia de los Libros de abstracts del Congres.

Tipo de Material	Nº Correlativo (si es necesario)	Caracterización (título)
Ej.:		
Artículo		
Foto		
Foto		

10. Aspectos Administrativos

10.1. Organización previa a la actividad de formación

a. Conformación del grupo

___ muy difícil ___ **X** sin problemas ___ algunas dificultades

(Indicar los motivos en caso de dificultades)

b. Apoyo de la Entidad Responsable

___ **X** bueno ___ regular ___ malo

(Justificar)

c. Información recibida durante la actividad de formación

___ amplia y detallada ___ **X** aceptable ___ deficiente

d. Trámites de viaje (visa, pasajes, otros)

___ **X** bueno ___ regular ___ malo

e. Recomendaciones (señalar aquellas recomendaciones que puedan aportar a mejorar los aspectos administrativos antes indicados)

10.2. Organización durante la actividad (indicar con cruces)

Ítem	Bueno	Regular	Malo
Recepción en país o región de destino	X		
Transporte aeropuerto/hotel y viceversa	X		
Reserva en hoteles	X		
Cumplimiento del programa y horarios	X		

En caso de existir un ítem Malo o Regular, señalar los problemas enfrentados durante el desarrollo de la actividad de formación, la forma como fueron abordados y las sugerencias que puedan aportar a mejorar los aspectos organizacionales de las actividades de formación a futuro.

11. Conclusiones Finales

Mi participación en el 17 Congreso de Ciencias del Suelo permitió acrecentar mi acervo científico relacionado con la utilización de microorganismos en la movilización de nutrientes desde el suelo, entregándome además una tremenda potencialidad en términos de intercambio científico debido a los contactos que se tuvieron con investigadores asistentes a dicho evento.

12. Conclusiones Individuales

Son las mismas que en el punto anterior.

Fecha: 04 Dcbr 2002

Nombre y Firma coordinador de la ejecución: Fernando Quiroz

AÑO 2002

17 การประชุมวิทยาศาสตร์ดินนานาชาติ World Congress of Soil Science

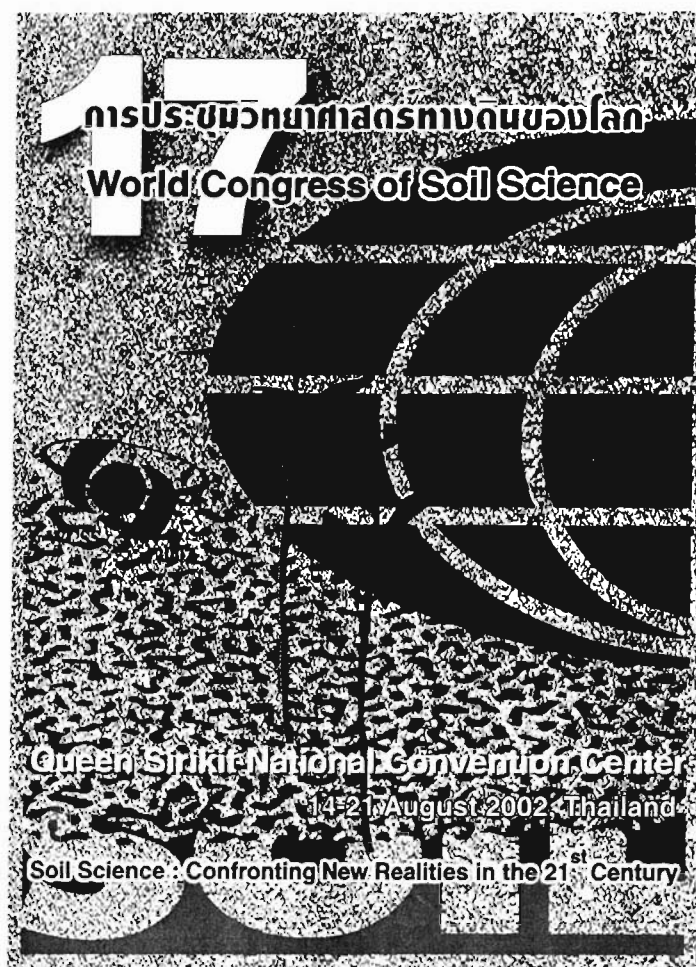


Queen Sirikit National Convention Center
14-21 August 2002, Thailand

Soil Science : Confronting New Realities in the 21st Century

KEYNOTE LECTURES





ABSTRACTS

Volume I

Symposia 01-12



17

การประชุมวิทยาศาสตร์ทางดินของไทย
World Congress of Soil Science

Queen Sirikit National Convention Center
14-21 August 2002, Thailand
Soil Science: Confronting New Realities in the 21st Century

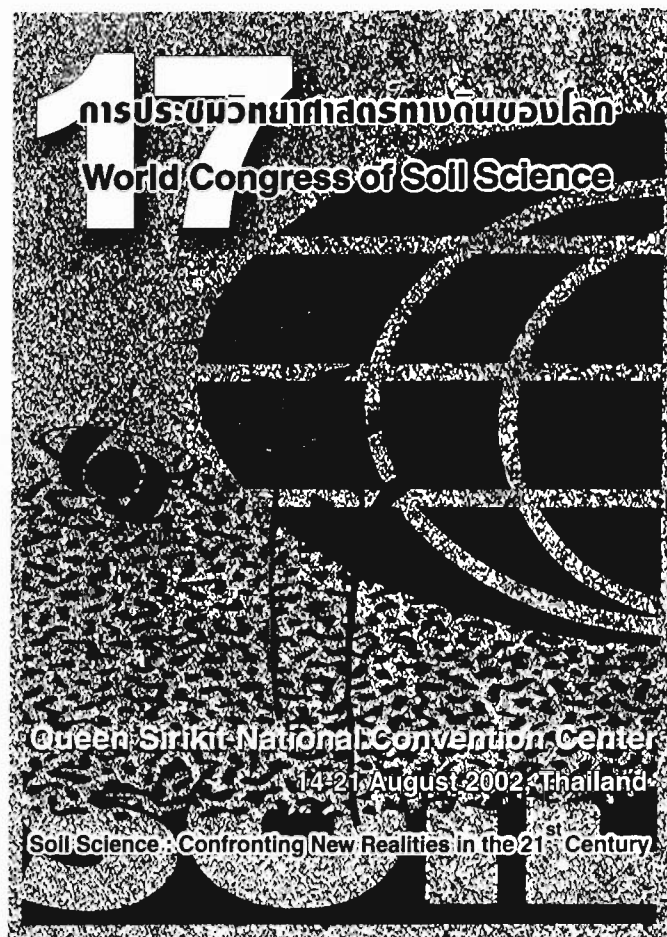


ABSTRACTS

Volume II

Symposia 13-21





ABSTRACTS

Volume III Symposia 22-36



17

การประชุมวิทยาศาสตร์ทางดินของโลก
World Congress of Soil Science

Queen Sirikit National Convention Center

14-21 August 2002, Thailand

Soil Science: Confronting New Realities in the 21st Century

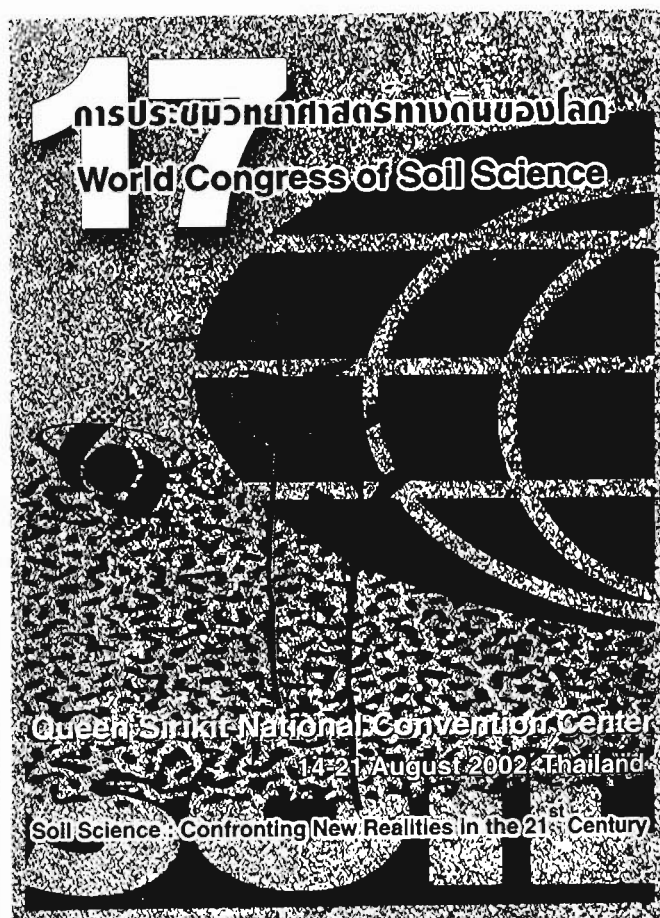


ABSTRACTS

Volume IV

Symposia 37-52





ABSTRACTS

Volume V

Symposia 53-65



Yoav Bashan · Juan-Pablo Hernandez
Luis A. Leyva · Macario Bacilio

Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria

Received: 26 November 2001 / Accepted: 22 March 2002 / Published online: 24 May 2002
© Springer-Verlag 2002

Abstract A method of inoculating wet and dry seeds with plant growth-promoting bacteria (PGPB) using alginate microbeads as a substrate and *Azospirillum brasilense* as the model PGPB was developed. The microbeads were produced by low pressure spraying of an alginate solution mixed with liquid bacterial culture suspended in a very rich medium through a small nozzle resulting in small-diameter droplets. These droplets, when sprayed into a slowly stirred solution of CaCl_2 , immediately hardened into microbeads at diameters ranging between 100 and 200 μm . Although the process killed part of the entrapped bacteria, the remaining bacteria residing in the microbeads were sufficient [$>10^{11}$ colony-forming units (CFU) g^{-1} inoculant] for seed inoculation. Further, it was found that the bacterial population in the inoculant could be enhanced by secondary multiplication in the same medium for an additional 16 h. It was found that the microbeads could be used either wet or dry. Dry inoculant was produced using dry air at 38°C , creating a powdery substance loaded with $>10^9$ CFU g^{-1} beads. Alternatively, dry microbeads were produced using a standard freeze-drying procedure. This dry preparation was easily attached to dry seed surfaces with the addition of 1% alcohol-diluted lecithin or with 0.5% synthetic paper adhesive (Resistol). The bacteria were slowly released from the microbeads in amounts ranging from 10^4 to 10^6 CFU g^{-1} depending on the type (wet or dry, with or without skim milk) and the time of incubation (the longer the incubation period, the smaller the amount of bacteria released with time). The wet and dry inocul-

ants enhanced the development of wheat and tomato seedlings growing in unfertile soil, and biodegraded within 15 days in moist soil.

Keywords Alginate · *Azospirillum* · Bacterial inoculants · Beneficial bacteria · Bacterial immobilization

Introduction

To date, most marketed bacterial inoculants are peat-based formulations used to coat seeds or pellets for sowing in furrows (Bashan 1998; Kenny 1997; Smith 1992). They usually produce satisfactory results primarily with rhizobia (Burton 1976; Thompson 1980), but the technological limit of their development has almost been reached. They have several severe drawbacks because of the nature of peat, and the unavailability of peat in many countries. During the last decade, several experimental formulations based on polymers have been evaluated (Bashan 1998). These polymers were demonstrated as potential bacterial carriers (Jung et al. 1982) offering substantial practical advantages over peat (Amiet-Charpentier et al. 1998, 1999). These formulations encapsulate the living cells, protect the microorganisms against many environmental stresses and release them to the soil gradually when soil microorganisms degrade the polymers. They can be stored dry at ambient temperatures for prolonged periods, offer consistent batch quality and a better-defined environment for the bacteria, and can be manipulated easily according to the needs of specific bacteria or the crop. These inoculants can be amended with nutrients to improve the short-term survival of the bacteria upon inoculation, especially with associative plant growth-promoting bacteria (PGPB) (Bashan 1986a, 1998). However, they are rather expensive relative to peat-based inoculants and require more biotechnical handling by the inoculant industry (Fages 1990, 1992). There is no commercial agricultural inoculant so far that uses this technology. But environmental applications for the clean-up of hazardous materials are entering the market (Cassidy et al. 1996; Sterner and Crawford 1992).

This paper is in memory of the late Mr Avner Bashan and the late Mr Uzi Bashan of Israel

Y. Bashan (✉) · L.A. Leyva · M. Bacilio
Environmental Microbiology,
The Center for Biological Research of the Northwest (CIBN),
La Paz, P.O. Box 128, B.C.S., 23000, Mexico
e-mail: bashan@cibn.mx
Fax: +52-612-1254710

J.-P. Hernandez
Laboratorios Agroenzimas, Tlanepantla, Mexico City, Mexico

Alginate is the most common polymer material for the encapsulation of microorganisms for various industrial microbiological purposes (Chen and Huang 1988; Fenice et al. 2000; Paul et al. 1993; Smidsrod and Skjak-Braek 1990; Walker and Connick 1983), although other algal polysaccharides have been used (Hammill and Crawford 1997). The raw material, the kelp macroalga (*Macrocystis pyrifera*), is a renewable marine resource of great abundance in the Pacific Ocean (Lada et al. 1999); it is harvested regularly and processed (Hernández-Carmona et al. 1999) mainly for the food industry. The most common experimental formulation for bacterial inoculants is macrobeads with a diameter of 1–4 mm either for agricultural or environmental use (Bashan 1986a, 1998; Gonzalez and Bashan 2000). Nonetheless, their relatively large size is disadvantageous for agricultural uses. To produce smaller size beads, two possibilities exist: (1) to mechanically crush large beads or solid alginate sheets and then to sieve the powder to the desired size, and (2) to produce micro beads directly using an appropriate technology.

The aims of this study were to demonstrate: (1) the technical feasibility of direct alginate microbead production; (2) that these microbeads can be dried, thus conserving the majority of the bacterial population; (3) that these microbeads can be attached to seed prior to sowing; and (4) that these preparations can release the bacteria and enhance plant growth. This study employed the wild type bacteria, *Azospirillum brasilense* Cd, commonly used for agricultural inoculation (Bashan and Holguin 1997) as a model microorganism and wheat and tomato as model plants.

Materials and methods

Equipment for microbead production

The production of microbeads (encapsulated bacteria in an alginate matrix) has been accomplished using a prototype device described earlier (Fig. 1; Carrillo and Bashan 1997) after incorporating minor modifications. These include using stainless steel for its construction to allow sterilization by autoclave, and positioning the entire equipment at 45° inclination allowing production of a stream of droplets instead of vertical output of spray. It was built of commonly used materials by the CIB Technical Directorate's workshop. The basic design can be modified or modularly enlarged to produce a larger amount of microbeads without compromising the basic features. This prototype produces microbeads ranging in size from 100 to 200 µm.

Bacteria and bacterial growth conditions

Azospirillum brasilense Cd (ATCC 29710) served as a model bacterium for this study and was cultivated according to the standard procedure for this genus (Bashan et al. 1993). Briefly, the pre-inoculum was prepared on a nutrient agar (Difco, Mich.) plate at 30±2°C for 48 h. Several identical developing colonies were transferred into a liquid nutrient broth medium and were grown for 12 h at 30±2°C in a rotary shaker at 120 r.p.m. The inoculum was harvested by centrifugation (7,000 g, 10 min), washed twice in potassium phosphate buffer (pH 7.0; 0.06 mol l⁻¹) and supplemented with 0.15 mol NaCl l⁻¹ (Bashan 1986). To obtain a higher yield of bacteria, a trypton yeast extract glucose (TYG) medium was used (Prabhu et al. 2000). This medium contains: 5 g trypton l⁻¹

(Difco), 5 g yeast extract l⁻¹ (Sigma), and 5 g D-glucose l⁻¹. This basic medium was improved by supplementing it with the following salts: 4.8 g KOH l⁻¹; 1.2 g NaCl l⁻¹; 0.25 g MgSO₄·7H₂O l⁻¹; 0.13 g K₂HPO₄ l⁻¹; 0.22 g CaCl₂ l⁻¹; 0.17 g K₂SO₄ l⁻¹; 2.4 g Na₂SO₄ l⁻¹; 0.5 g NaHCO₃ l⁻¹; 0.09 g Na₂CO₃ l⁻¹; 0.07 g Fe(III) EDTA l⁻¹; the pH was adjusted to 7.0 after sterilization. The N-free OAB medium (Bashan et al. 1993) supplemented with 8 mM fructose and 0.5 mM KNO₃ (Sadasivan and Neyra 1985) was used as a reference medium. The growth conditions of bacteria in all media were similar and all cultures were similarly washed after growth.

Microbead formation

Ten millilitres of bacterial suspension obtained after cultivation in improved TYG medium was mixed under aseptic conditions with 2% sodium alginate (CICIMAR, La Paz, Mexico) under low stirring at ambient temperature for 1 h when all the ingredients were thoroughly mixed. The bacterial concentration at this stage was 10¹⁰ colony-forming units (CFU) ml⁻¹ solution. Alternatively, skim milk without Ca (Difco; 0.75%) was added to the alginate-bacterial suspension to produce beads that are more biodegradable (Bashan 1986a). Each of these suspensions was then placed in an Erlenmeyer flask or a beaker that was attached to the microbead-producing device and the device was pressurized at 10–15 psi using a commercial air compressor. The bacterial suspension sucked from the Erlenmeyer flask was then forced to pass through a 222-µm-diameter capillary exit, which created a fine spray of miniature droplets. The mist was sprayed into a 25×40-cm stainless steel flask rotating at 40 r.p.m. and containing 0.1 M CaCl₂. Microbeads were formed instantly upon contact of the droplets with the solidifying solution. The microbeads were allowed to cure in the CaCl₂ solution for 30 min. This procedure produced microbeads ranging in size from 100 to 200 µm. At this stage, the bead bacterial concentration was 2×10¹¹ CFU g⁻¹ microbeads on average (fresh concentration; for more details see the Result section). After extracting the wet beads from the CaCl₂ solution, they were rinsed in 500 ml saline solution (0.85% (w/v) NaCl) 4 times under aseptic conditions and transferred into fresh TYG medium. Bacteria were multiplied in this mixture for an additional 12 h at 30±2°C and 100 r.p.m. Then the microbeads were separated from the suspension by filtration using Whatman no. 4 filter paper, and rinsed 3 times with 500 ml saline solution. The population in fresh beads after this secondary multiplication always reached a concentration of at least 1×10¹² CFU g⁻¹ microbeads. Usually, wet preparations of microbeads at this stage were used for plant inoculation immediately or after overnight storage at 4±1°C, which did not affect the number of bacteria in the preparation.

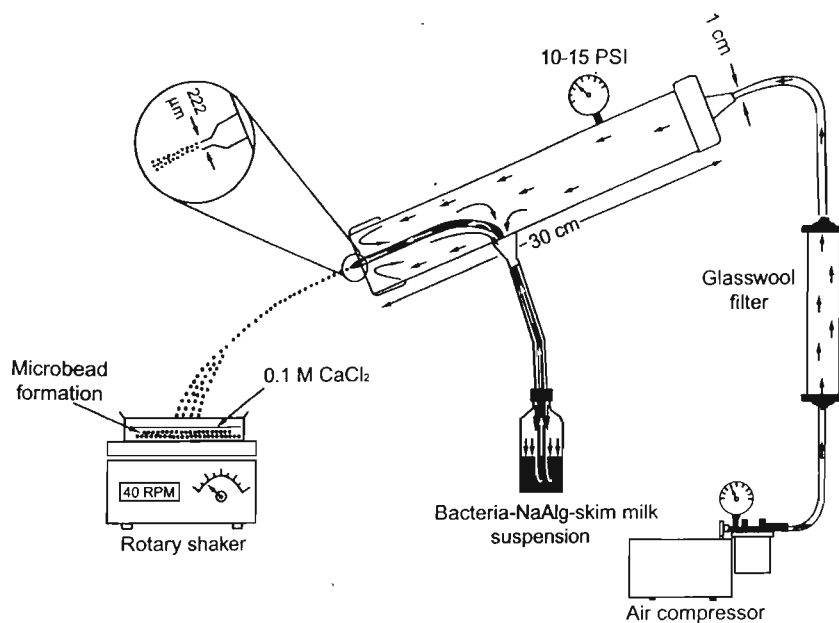
Drying procedures

Ten grams of microbeads was placed in a thin layer on a filter paper in a Petri dish and dried at 38±1°C for 48 h. Then the dry microbeads were collected and stored in hermetically sealed containers with silica gel until usage. Additionally, dry beads were prepared by standard lyophilization (Virtis 5L, N.Y.).

Seed coating with microbeads and microbead counts from seeds

Dry or wet microbeads were manually mixed with dry seeds of wheat and tomato. Alternatively, a very dilute solution of adhesive (described later) was applied to the seeds. This solution created a sticky surface but did not allow the seeds to stick to one another. Four sticky substances were used: (1) lecithin (solidified fatty acids derived from soybean, 0.1% and 0.5% dissolved in ethanol) that was evaporated immediately by exposure to ambient temperature and dried with an unheated hair dryer; (2) 0.5% Agri-co (Laboratorios Agroenzimas, Hualpamtlá, Mexico City) dissolved in water; (3) synthetic paper adhesive (0.1%, 0.5% and 1% Resis-

Fig. 1 Equipment for the production of microbeads. The original drawing is reproduced from Carrillo and Bashan (1997), by permission of the publisher



tol, Mexico) dissolved in water; and (4) undiluted mineral oil. All these sticky substances were first mixed, separately, with the seeds. Then the microbeads were mixed with the sticky seeds manually. Microbeads adhering to seeds were counted under stereoscopic microscope or by taking images of seeds by image analyzer (Image Pro Plus 4.1, Dell, USA, connected to an Olympus BX41 microscope) and allowing automatic counting of microbeads by the software. Data are presented using the following indices: 1=<50 microbeads seed⁻¹; 2=50–100 microbeads seed⁻¹; 3=100–150 microbeads seed⁻¹; 4=150–200 microbeads seed⁻¹.

Bead and root bacterial counts and slow release of bacteria from beads

The beads were dissolved in 0.2 M, pH 7.0 phosphate buffer for 1–2 h at 30°C in a rotary shaker at 100 r.p.m. which released the bacteria entrapped in or covering the microbeads. The released bacteria were counted using the conventional plate count method on nutrient agar (Difco). The slow release of bacteria from the microbeads was accomplished as follows: 0.5 g washed microbeads containing immobilized bacteria was transferred into 10 ml sterile saline solution [0.85% (w/v) NaCl] and gently shaken at 30±1°C for 16 h. Then, triplicate 0.1-ml samples of saline solution were collected, and the number of released bacteria was determined by the plate count method on nutrient agar plates. The microbeads were rinsed twice with sterile water and transferred into fresh saline solution, and the procedure was repeated after 24 h. Afterwards, the microbeads were kept at 4±1°C under a thin layer of water, and the procedure was repeated after 5 days and again after 10 days (Bashan 1986a). After the inoculated plants were allowed to grow, they were harvested and root colonization by *A. brasilense* strains was determined as described before (Bashan and Levany 1989).

Transmission and scanning electron microscopy

Over 25 of each type of wet and dry microbead, taken randomly from the production line of microbeads, were prepared for observation by two types of electron microscopy using methods described earlier for scanning electron microscopy (SEM; Patente et al. 1999) and for transmission electron microscopy (TEM) (Lebsky et al. 2001).

Biodegradation of microbeads in desert soil

Four types of beads (alginate alone, alginate with 0.75% skim milk, and each with and without immobilized bacteria) were placed in 5×5-cm very fine mesh (10–20 μm) nylon bags, with 40 microbeads bag⁻¹, and were buried 5 cm below the soil surface in the natural soil described below for plant cultivation. The soil was maintained at 30°C for 15 days and was kept slightly below water saturation by adding distilled water as necessary. Every 3 days the bags were pulled out from the soil and each of the beads was examined under a stereoscopic microscope. The following indices were used to score the biodegradation of beads: 0=microbead not degraded; 1=little degradation with small holes and deformations in the bead structure; 2=completely degraded and the microbead was absent from the bag. Data presented are from all the beads examined of each type.

Inoculation of wheat plants with microbead inoculant containing *A. brasilense* as PGPB

It was desirable to check the microbead carriers under the realistic soil conditions prevailing in desert area agriculture. At the same time, it was desirable to avoid masking the effect of *A. brasilense* sp. inoculation by too rich a desert soil where the PGPB is less effective (Carrillo-Garcia et al. 2000). All experiments described in this study were carried out in pots. Pot experiments were conducted in a 1:1 (v:v) mixture of 500-mesh-sieved poor desert soils obtained from barren areas where perennial plants usually do not grow, and sieved rich desert soils found under the canopies of old mesquite trees in the same areas supporting exuberant perennial growth (Carrillo-Garcia et al. 1999). The detailed analysis of each soil was published earlier (Bashan et al. 2000; Carrillo-Garcia et al. 2000). The soil mixture contained the following: 3,750 mg Ca kg⁻¹ dry soil; 790 mg Na kg⁻¹ dry soil; 750 mg Mg kg⁻¹ dry soil; 2,300 mg N kg⁻¹ dry soil; 1,000 mg total P kg⁻¹ dry soil; 100 mg orthophosphate kg⁻¹ dry soil; 500 mg K kg⁻¹ dry soil; 0.74 mg Cu kg⁻¹ dry soil; 0.77 mg Zn kg⁻¹ dry soil; 3.85 mg Fe kg⁻¹ dry soil; 55 mg Mn kg⁻¹ dry soil; 12,000 mg total dissolved solids, kg⁻¹ dry soil; conductivity, 2,400 μS cm⁻¹; 35.3 g total C kg⁻¹; 18.6 g inorganic C kg⁻¹; cation exchange capacity, 20.6 mEq 100 g soil⁻¹; pH 6.78. Wheat (*Triticum aestivum* cv. Batequin F 97), and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. APT 127; Asenosa, Mexico) seeds were coated with microbead-encapsulated bacteria as follows. The growth substrate was placed in round, white, opaque

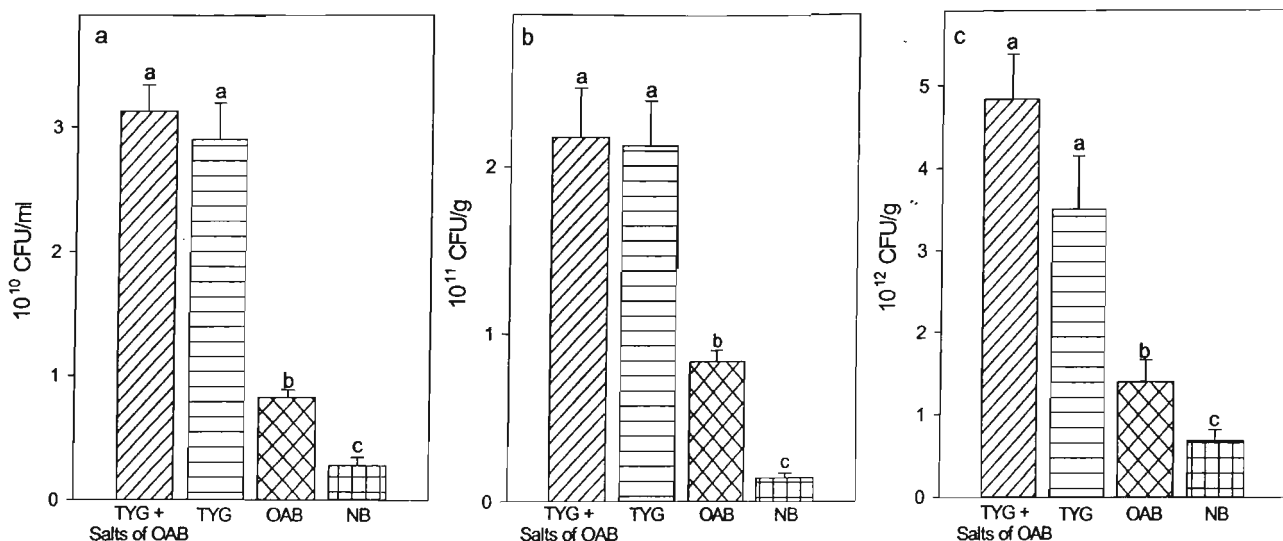


Fig. 2 **a** Development of *A. brasilense* Cd in various growth media. **b** The number of encapsulated bacteria in microbeads using the same media as part of the bead structure. **c** The level of bacteria in various microbead after an additional growth period inside the bead supported by the same media. Bars denoted by a different letter differ significantly at $P \leq 0.05$ according to one-way ANOVA. Error bars represent SE. TYG Trypton-yeast extract-glucose medium, OAB N-free medium supplemented with fructose and NO_3^- , NB nutrient broth, CFU colony-forming unit

100-ml pots of 5.5 cm diameter and 4.5 cm effective soil height. The substrate was saturated with distilled water before sowing. The pots were immediately sown with inoculated seeds. The level of inoculation was 200 microbeads seed⁻¹ on average, corresponding to 2×10^5 CFU seed⁻¹. Pots containing wheat were incubated in a growth chamber at $22 \pm 2^\circ\text{C}$, for 14 h under illumination of $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Convion TC 16; Controlled Environments, Winnipeg). To prevent the collapse of wheat leaves during longer experiments, each pot was equipped with a 30-cm-high mechanical support made of galvanized 1-mm wire and three plastic rings of 5.5 cm diameter spaced vertically every 10 cm. Tomato plants were inoculated similarly to wheat but were incubated at $30 \pm 2^\circ\text{C}$. No fertilization was applied, as the plants did not show any deficiency during the course of the experiment. Distilled water was added only when needed to keep the pots moist without exceeding the water holding capacity. Plant height was evaluated during the growth and the dry weight of roots and leaves was measured at the end of the experiments, usually 21–30 days after germination.

Dry weight determination

Dry weight was measured by placing the shoots and roots, separately, into small, pre-weighed brown paper bags for large root systems or pre-weighed aluminium foil pouches for small root systems and drying them in a forced-draught oven at $75 \pm 2^\circ\text{C}$ for 16 h.

Experimental design and statistical analysis

Six experiments for wheat and three for tomato were carried out. Four of the wheat experiments and the three tomato experiments were set up in a randomized design in identical manner: ten replicates each, containing eight seedlings pot⁻¹ (i.e. a total of 80 plants per treatment). The experimental design of the other two wheat experiments was a randomized block design (five blocks, four treatments, four pots per treatment, ten plants per pot). Treat-

ments included: plants inoculated with live *A. brasilense* in microbeads, heat-killed *A. brasilense* in microbeads, microbeads alone and non-inoculated plants. Results of all experiments for each plant species were combined for statistical analysis. For the laboratory experiments, experiments for the selection of the best medium were done in triplicate where one Erlenmeyer flask served as a replicate. Adhesion of microbeads to seeds was done in triplicate where ten seeds served as a replicate. For the biodegradation of microbeads in soil, ten replicates per treatment were used. One pot containing three bags of fine nylon mesh, each bag containing 40 microbeads, served as a replicate. Over 100 photomicrographs of microbeads were taken under electron microscopy in this study. All these laboratory experiments were repeated 3 times and results presented are the averages of all experiments. Statistical analysis was done by ANOVA or Student's *t*-test at $P \leq 0.05$ and data were analysed by Statistica software (Statsoft, Tulsa, Okla.). All graphical data are shown with SEs.

Results

Mass production of cells for immobilization and bacterial concentration in microbeads

Four different culture media were screened for their capacity to sustain high growth rates of *A. brasilense* and their suitability for immobilization of the bacteria in microbeads. The media, organized in order of greater bacterial growth were: TYG plus salts, TYG, OAB supplemented with fructose and NO_3^- , and nutrient broth. The TYG medium with salts of the OAB medium was found to be the superior medium, and the commonly used nutrient broth yielded the lowest bacterial population (Fig. 2a). After immobilization, the population in each type of bead significantly declined (Fig. 2b). However, the relative differences in the populations supported by each media persisted. Secondary multiplication increased the populations but the order stated above remained unchanged (Fig. 2c). Drying of the beads, both by lyophilization and by low heat, yielded dry microbeads loaded with significant amounts of bacteria: $3 \pm 0.9 \times 10^9$ CFU g⁻¹ heat-dried microbeads and $2.4 \pm 0.5 \times 10^9$ CFU g⁻¹ freeze-dried microbeads. SEM and

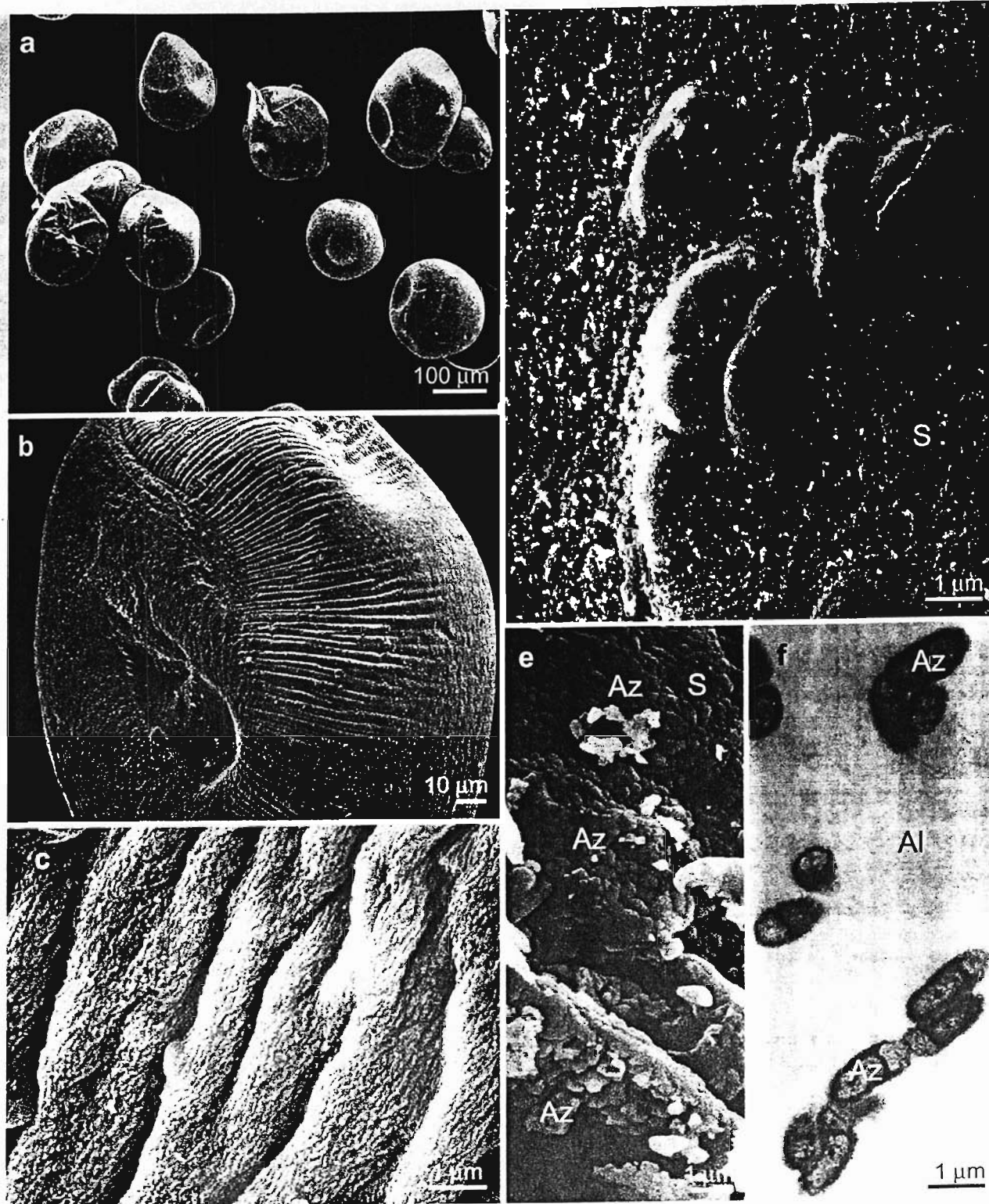


Fig. 3a–f Scanning electron microscopy of microbeads. **a** Microbeads after formation and curing with or without bacteria appear similar at this magnification; **b** a microbead without bacteria; **c** a close up of the surface of a microbead without bacteria; **d** microcolonies of *A. brasilense* Cd on the surface of wet microbead; **e** microcolonies of *A. brasilense* Cd on the surface of a dry (lyophilized) microbead; **f** a transmission electron microscopy of *A. brasilense* Cd inside a wet microbead. **Al** Alginate, **Az** *A. brasilense* Cd, **S** surface of the microbead

TEM revealed that the surfaces of the beads, as well as their interiors, were populated with bacteria (Fig. 3).

Slow release of bacteria from dry and wet microbeads

Wet and dry microbeads containing bacteria were tested for their ability to release the entrapped bacteria. Table 1

Fig. 4 **a** Attachment of dry microbeads to the surface of seeds using four adhesive agents. Bars denoted by a different letter differ significantly at $P \leq 0.05$ according to one-way ANOVA. Error bars represent SE. **b** Attachment of heat-dried microbead with lecithin to wheat seeds, dyed by 1% methylene blue for better visualization of microbeads. **c** Attachment of a lyophilized dry bead with lecithin to wheat seed (W). Arrows indicate microbeads. 1 <50 Microbeads seed⁻¹, 2 50–100 microbeads seed⁻¹, 3 100–150 microbeads seed⁻¹, 4 150–200 microbeads seed⁻¹

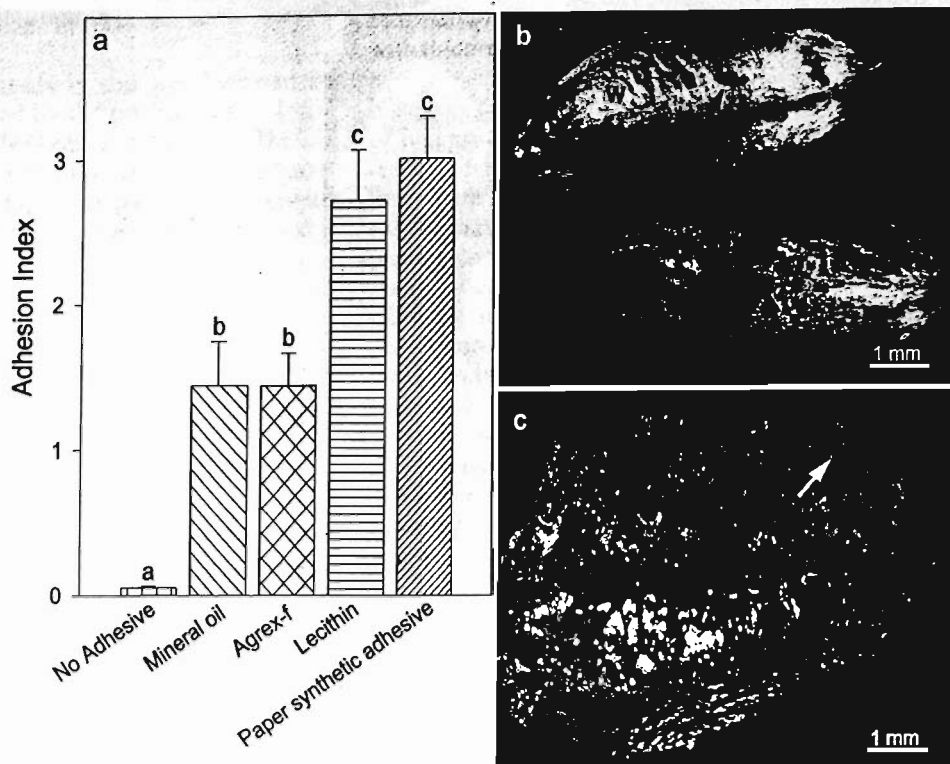


Table 1 Slow release of *A. brasilense* Cd from wet and dry microbeads. CFU Colony-forming units

Microbead concentration (CFU g ⁻¹)	10 min		24 h		144 h		240 h	
	Wet	Dry	Wet	Dry	Wet	Dry	Wet	Dry
Type								
Alginate	9.2±0.3×10 ^{5a}	25±12 ^c	2.2±0.3×10 ⁵	3.7±0.6×10 ³	2.1±0.6×10 ⁵	2.3±0.4×10 ⁵	7.2±0.2×10 ⁴	6.3±0.1×10 ⁵
Alginate plus skim milk	7.8±0.3×10 ^{7b}	17±6 ^d	1.7±0.4×10 ⁶	4.62±0.5×10 ⁴	9.1±0.7×10 ⁵	5.2±0.2×10 ⁵	4.2±0.9×10 ⁵	2.7±0.6×10 ⁵

^a Initial concentration of bacteria in wet alginate bead was 2×10^{11}
^b Initial concentration of bacteria in wet alginate plus skim milk bead was 2.2×10^{11}

^c Initial concentration of bacteria in dry alginate bead was 3×10^9
^d Initial concentration of bacteria in dry alginate plus skim milk bead was 3.9×10^9

shows that immediately after formation, wet beads were able to release 10^5 CFU g⁻¹ microbeads and 10^7 CFU g⁻¹ microbeads with and without skim milk, respectively; levels that remained for the next 24 h. To avoid starvation of the bacteria, the sampling was stopped after 24 h and the beads were stored at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ for additional 5- and 10-day periods. The beads continued to release bacteria when heated to 30°C after those periods. The numbers of released bacteria were comparable to the initial measurement after 5 days and were a little lower after 10 days. A similar trend was observed with beads containing skim milk. However, the released number of bacteria was higher after each period of sampling (Table 1). Dry microbeads did not release significant numbers of bacteria upon formation, and even after 24 h the number released was lower than for wet beads. However, after

longer periods of storage and after being transferred to wet conditions, they released the bacteria equally as well as wet microbeads (Table 1).

Attaching microbeads to seeds using adhesives

Four types of adhesives were used to attach the microbeads to wheat seeds, since only zero to five dry microbeads clung to each seed without adhesive. Wet microbeads, in contrast, stuck well at over 100 microbeads seed⁻¹ without adhesive. Of the four adhesives, 0.5% and 1% lecithin and 0.5% Resistol were the best and equal in adhesiveness (Fig. 4a). Image analysis of the surface indicates random distribution of the microbeads, either wet or dry, over the surface of the seeds (Fig. 4b).

Biodegradation of microbeads in soil

Biodegradation of microbeads in soil was followed for 15 days and was influenced by the presence of *A. brasilense* and skim milk in the bead construction. The observed level of biodegradation of beads containing bacteria or skim milk after 15 days (Fig. 5) was much greater than for beads containing no skim milk and no bacteria (Fig. 5).

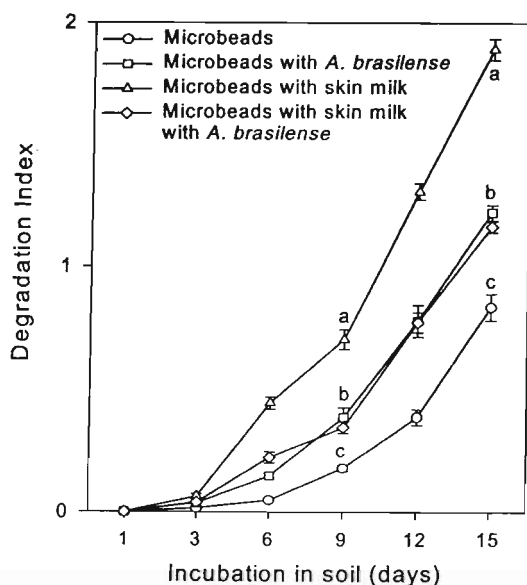
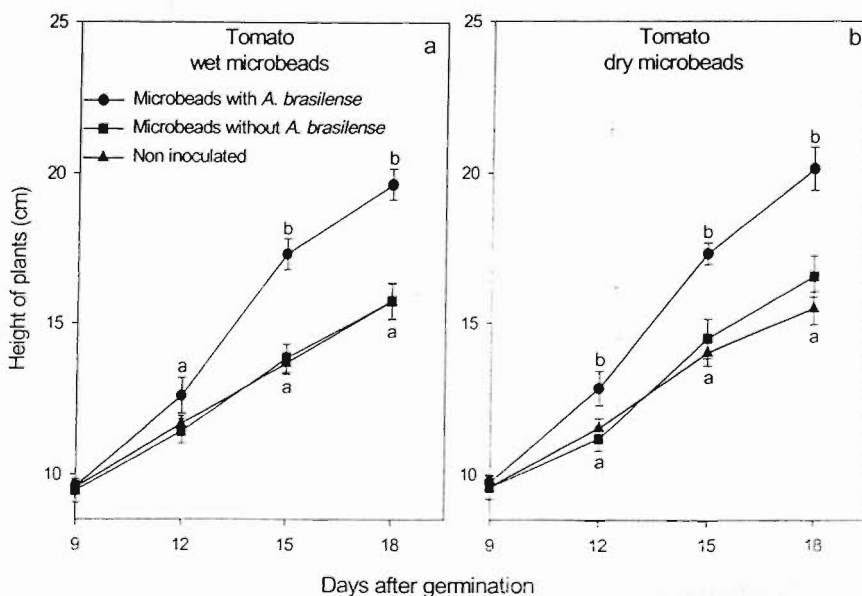


Fig. 5 Biodegradation of various types of bead in poor soil with time. Data points at the same time denoted by a different letter differ significantly at $P \leq 0.05$ according to one-way ANOVA. Error bars represent SE. 0 microbead not degraded, 1 little degradation with small holes and deformations in the bead structure, 2 completely degraded and the microbead was absent from the bag

Fig. 6 The effect of inoculation with *A. brasilense* in microbeads on the height of wheat and tomato seedlings. a Wet microbeads; b dry microbeads. Data points at the same time denoted by a different letter differ significantly at $P \leq 0.05$ according to one-way ANOVA. Error bars represent SE



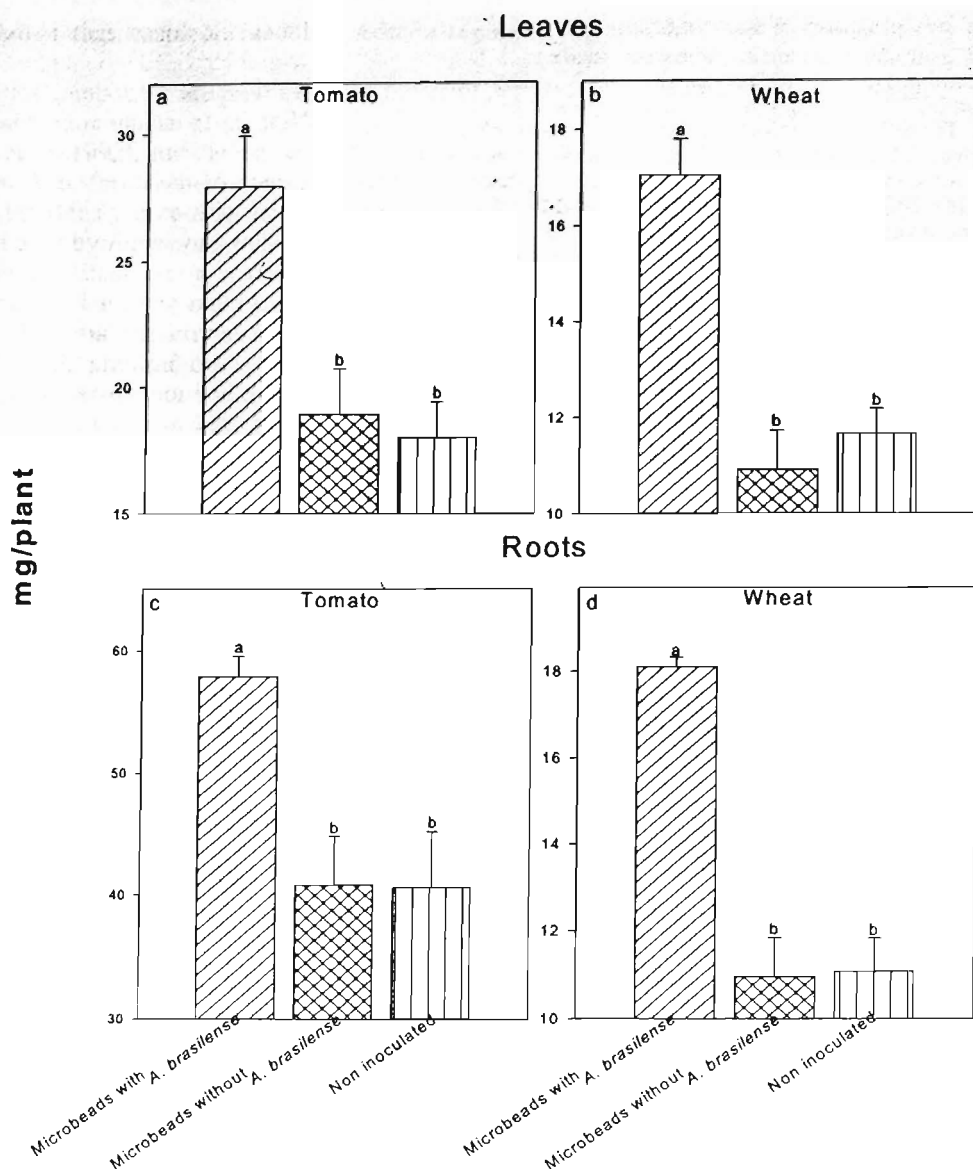
Inoculation of wheat and tomato plants with microbead inoculants containing *A. brasilense*

Nine independent inoculation experiments were conducted in a growth chamber environment to evaluate the efficiency of the microbead inoculant (six with wheat and three with tomato). Microbeads by themselves did not exhibit any improvement of plant growth when compared to non-inoculated controls or to heat-killed bacteria controls (data not shown). Similarly, inoculation with unloaded microbeads or with those loaded with live or heat-killed bacteria did not affect the germination of wheat and tomato seeds, which was at the commercially acceptable market level of $>85\%$ (data not shown). However, inoculation of both wheat and tomato plants with *A. brasilense* encapsulated in the alginate microbeads described in this study, in both wet and dry formulations, significantly increased plant height (Fig. 6a, b). Similar results were obtained with wheat plants. The dry weight of both shoots (Fig. 7a–c) and roots (Fig. 7c, d) of both tomato and wheat plants increased. The average concentration of *A. brasilense* Cd in the roots at the end of the experiments was 1.1×10^5 CFU g^{-1} dry root.

Discussion

The main advantages of alginate preparations are their non-toxic nature, degradation in the soil, their slow release of microorganisms into the soil (Bashan 1998; van Elsas and Heijnen 1990) and almost unlimited shelf life (Bashan and Gonzalez 1999). The preparation of macroalginate beads 1–3 mm in diameter containing bacteria is fairly easy and is a multi-step procedure (Bashan 1986a; Digat 1991). Several alginate-based preparations were evaluated for agricultural purposes including the encapsulation of biocontrol agents against soil-borne patho-

Fig. 7a-d The effect of inoculation with *A. brasilense* in microbeads on the dry weight of leaves and roots of wheat and tomato seedlings after 21 days. Bars denoted by a different letter differ significantly at $P \leq 0.05$ according to one-way ANOVA. Error bars represent SE



gens (DeLucca et al. 1990; Fravel et al. 1985; Lewis and Papavizas 1985; Russo et al. 1996) and phosphate-solubilizing bacteria (Vassilev et al. 1997). This technology was also employed to encapsulate the PGPBs *A. brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* (Bashan 1986a) that were successfully used to inoculate wheat plants under field conditions (Bashan et al. 1987). Encapsulated genetically engineered *P. fluorescens*, released later into soil microcosms, showed significantly increased survival rates over non-encapsulated cells after 3 months (Trevors et al. 1992; van Elsas et al. 1992).

The use of macro-alginate beads has three major disadvantages:

1. O_2 diffusion into the bead is limited, making about 80% of the bead volume uninhabitable for aerobic PGPB (Sun et al. 1989).
2. The bacteria must move through the soil from the bead towards the plants (Bashan and Holguin 1994).

Using conventional agricultural practices, the beads containing the bacteria might fall up to several centimetres from the seeds when beads are loosely mixed with seeds and sown together. The bacteria released from the beads would then have to migrate through the soil, facing competition from the native microflora. Sometimes, the absence of a continuous film of water would temporarily block their movement. These distances might be proven prohibitively large for many PBPGs, even those with proven soil motility like *A. brasilense* (Bashan and Holguin 1994). Root colonization might then not occur and no beneficial effect would be observed on the plants.

3. There is need for an additional, specialized treatment during sowing (Bashan 1998).

To overcome these problems, the microbead concept was conceived. If the beads were small but capable of encapsulating sufficient bacteria, it would be possible to pro-

duce a powder-like formulation that could be used in seed coating.

Microbeads made of various compounds are produced by the pharmaceutical industry (Broadhead et al. 1992; Matulovic et al. 1986; Wan et al. 1992), and can be produced in various diameters. Wet formulated beads of 2–50 µm in diameter were previously proposed for the degradation of pentachlorophenol by *Flavobacterium* sp. (Stormo and Crawford 1992). From an agricultural standpoint, these ultra-small beads have two main disadvantages, namely insufficient bacterial capacity and their wet preparation. Theoretically, a 50-µm bead cannot contain more than 10^4 CFU bead⁻¹ of *Azospirillum*-like bacteria. It is well established that for successful inoculation with *A. brasilense*, for example, 10^6 CFU seed⁻¹ are required (Bashan 1986b). Even higher populations are required of some biocontrol agents. Beads of 200 µm diameter may theoretically hold $>10^6$ CFU bead⁻¹, so even one bead of this diameter will be sufficient to inoculate the seed if there is insufficient attachment to accommodate the desirable larger number of microbeads. Wet beads are impractical for agricultural use since very few farmers have the technical capacity to make appropriate seed coatings under field conditions, but future developments may make possible the use of these wet preparations like fertilizer in a drip irrigation system.

In the industry, a large concern about the activity of the entrapped bacteria in macrobeads is the restriction of O₂ diffusion into the bead (Chang and Mo 1988; Sun et al. 1989). Active aerobic cells may be found to a depth of only 50–200 µm into the bead, so about 80% of the volume of a 2-mm bead may contain inactive or even dead cells (Chen and Humphrey 1988). Although microaerophylic bacteria such as *A. brasilense* or *Azospirillum*-related microorganisms that have no difficulty with low O₂ tensions are easily encapsulated, aerobic PGPBs will be stressed in a macrobead formulation. In the case of the microbead formulation proposed here, this is not a problem since the diameter is smaller than the critical depth. A minor disadvantage of microbead production, however, is that the entrapping procedure kills a large number of the bacteria because of cross-linking of the alginate-calcium complex with the bacterial cell wall. This phenomenon was observed earlier with *A. brasilense* (Bashan 1986a) and with *Burkholderia cepacia* in an alginate-clay matrix (Fravel et al. 1985). However, it is easy to avoid this problem by secondary incubation of the microbeads in a new growth medium. The surviving bacteria will multiply and restore the concentration to that in the original growth medium. Furthermore, another advantage of the microbeads is the possibility to produce them dry. In the dry agricultural preparation the bacteria are inactive but alive, as is preferable since their activities are needed only after seed germination and the decomposition of the beads.

In conclusion, a simple method is being proposed in this study to produce microbeads useful for the application of PGPB to agricultural plants. Field application of this novel application is still pending.

Acknowledgements We thank Mr Angel E. Carrillo of CIB for many helpful suggestions concerning microbead production, Dr Radhakrishna Prabhu, Central Plantation Crops Research Institute, Kerala, India for his advice concerning the preparation of TYG medium, Mr Al Soeldner, Oregon State University, for SEM and TEM, Dr Vladimir Lebsky for advice on electron microscopy, Mr Taylor Morey for editing the English, Dr Gustavo Hernandez-Carmona from Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICMAR), La Paz, Mexico for donating alginate. This study was partially supported by Laboratorios Agroenzimas, Tlalnepantla, Mexico City (fellowships to J. P. H. and L. A. L.) and by the Bashan Foundation.

References

- Amiet-Charpentier C, Gadille P, Digat B, Benoit JP (1998) Microencapsulation of rhizobacteria by spray-drying: formulation and survival studies. *J Microencapsul* 15:639–659
- Amiet-Charpentier C, Gadille P, Benoit JP (1999) Rhizobacteria microencapsulation: properties of microparticles obtained by spray-drying. *J Microencapsul* 16:215–229
- Bashan Y (1986a) Alginate beads as synthetic inoculant carriers for the slow release of bacteria that affect plant growth. *Appl Environ Microbiol* 51:1089–1098
- Bashan Y (1986b) Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants. *Soil Biol Biochem* 18:297–301
- Bashan Y (1998) Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol Adv* 16:729–770
- Bashan Y, Gonzalez LE (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
- Bashan Y, Holguin G (1994) Root-to-root travel of the beneficial bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl Environ Microbiol* 60:2120–2131
- Bashan Y, Holguin G (1997) *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996). *Can J Microbiol* 43:103–121
- Bashan Y, Levanony H (1989) Factors affecting adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to root hairs as compared with root surface of wheat. *Can J Microbiol* 35:936–944
- Bashan Y, Holguin G, Lifshitz R (1993) Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria. In: Glick BR, Thompson JE (eds) *Methods in plant molecular biology and biotechnology*. CRC, Boca Raton, Fla. pp 331–345
- Bashan Y, Levanony H, Ziv-Vecht O (1987) The fate of field-inoculated *Azospirillum brasilense* Cd in wheat rhizosphere during the growing season. *Can J Microbiol* 33:1074–1079
- Bashan Y, Davis EA, Carrillo-Garcia A, Linderman RG (2000) Assessment of VA mycorrhizal inoculum potential in relation to the establishment of cactus seedlings under mesquite nurse-trees in the Sonoran desert. *Appl Soil Ecol* 14:165–176
- Broadhead J, Rouan ES, Rhodes CT (1992) The spray-drying of pharmaceuticals. *Drug Develop Ind Pharm* 18:1169–1206
- Burton JC (1976) Methods of inoculating seeds and their effect on survival of rhizobia. In: Nutman PS (ed) *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. Cambridge University Press, London. pp 175–189
- Carrillo A, Bashan Y (1997) Microencapsulation as a potential carrier for plant growth-promoting bacteria. In: Ogoshi A, Kobayashi K, Homma Y, Kodama F, Kondo N, Akino S (eds) *Plant growth-promoting rhizobacteria - present status and future prospects*. Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan. pp 460–463
- Carrillo-Garcia A, Leon de la Luz J-L, Bashan Y, Bethlenfalvay GJ (1999) Nurse plants, mycorrhizae, and plant establishment in a disturbed area of the Sonoran desert. *Restor Ecol* 7:321–335
- Carrillo-Gracia A, Bashan Y, Diaz-Rivera E, Bethlenfalvay GJ (2000) Effects of resource island soils, competition, and inoculation with *Azospirillum* on survival and growth of *Parrycercus pringlei*, the giant cactus of the Sonoran Desert. *Restor Ecol* 8:65–73

- Cassidy MB, Lee H, Trevors JT (1996) Environmental applications of immobilized cells: a review. *J Ind Microbiol* 16:79–101
- Chang HN, Moo YM (1988) Estimation of oxygen penetration depth in immobilized cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 29:107–112
- Chen KC, Huang CT (1988) Effects of the growth of *Trichosporon cutaneum* in calcium alginate gel. *Enzyme Microb Technol* 10:284–292
- Chen T-L, Humphrey AE (1988) Estimation of critical particle diameter for optimal respiration of gel entrapped and/or pelleted microbial cells. *Biotechnol Lett* 10:699–702
- DeLucca AJ, Connick WJ Jr, Fravel DR, Lewis JA, Bland JM (1990) The use of bacterial alginates to prepare biocontrol formulations. *J Ind Microbiol* 6:129–134
- Digat B (1991) A new encapsulation technology for bacterial inoculants and seed bacterization. In: Keel C, Koller B, Défago G (eds) Plant growth-promoting rhizobacteria – PROGRESS AND PROSPECTS. IOBC/WPRS bulletin. IOBC/WPRS, Zürich pp 383–391
- Elsas JD van, Heijnen CE (1990) Methods for the introduction of bacteria into soil: a review. *Biol Fertil Soils* 10:127–133
- Elsas JD van, Trevors JT, Jain D, Wolters AC, Heijnen CE, Overbeek LS van (1992) Survival of, and colonization by, alginate-encapsulated *Pseudomonas fluorescens* cells following introduction into soil. *Biol Fertil Soils* 14:14–22
- Fages J (1990) An optimized process for manufacturing an *Azospirillum* inoculant for crops. *Appl Microbiol Biotechnol* 32:473–478
- Fages J (1992) An industrial view of *Azospirillum* inoculants: formulation and application technology. *Symbiosis* 13:15–26
- Fenice M, Selbman L, Federici F, Vassilev N (2000) Application of encapsulated *Penicillium variable* P16 in solubilization of rock phosphate. *Biores Technol* 73:157–162
- Fravel DR, Marois JJ, Lumsden RD, Connick WJ (1985) Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix. *Phytopathology* 75:774–777
- Gonzalez LE, Bashan Y (2000) Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when co-immobilized and co-cultured in alginate beads with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl Environ Microbiol* 66:1527–1531
- Hamill TB, Crawford RL (1997) Bacterial microencapsulation with three algal polysaccharides. *Can J Microbiol* 43:1091–1095
- Hernández-Carmona G, McHugh DJ, López-Gutiérrez F (1999) Pilot plant-scale extraction of alginates from *Macrocystis pyrifera*. 2. Studies on extraction conditions and methods of separating the alkaline-insoluble residue. *J Appl Phycol* 11:493–502
- Jung G, Mugnier J, Diem HG, Dommergues YR (1982) Polymer-entrapped *rhizobium* as an inoculant for legumes. *Plant Soil* 65:219–231
- Kenney DS (1997) Commercialization of biological control products in the chemical pesticide world. In: Ogoshi A, Kobayashi K, Homma Y, Kodama F, Kondo N, Akino S (eds) Plant growth-promoting rhizobacteria – present status and future prospects. Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan. pp 126–127
- Lada L, Zertuche-González JA, Hernández Carmona G (1999) Giant kelp (*Macrocystis pyrifera*, Phaeophyceae) recruitment near its southern limit in Baja California after mass disappearance during ENSO 1997–98. *J Phycol* 35:1106–1112
- Lebsky VK, Gonzalez-Bashan LE, Bashan Y (2001) Ultrastructure of interaction in alginate beads between the microalga *Chlorella vulgaris* with its natural associative bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* and with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Can J Microbiol* 47:1–8
- Lewis JA, Papavizas GC (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
- Matulovic U, Rasch D, Wagner F (1986) New equipment for the scale-up production of small spherical biocatalysts. *Biotechnol Lett* 8:485–490
- Paul E, Fages J, Blanc P, Goma G, Pareilleux A (1993) Survival of alginate-entrapped cells of *Azospirillum lipoferum* during dehydration and storage in relation to water properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 40:34–39
- Prabhu SR, Thomas GV, Nierzwicki-Bauer SA, Prasad TG (2000) GA-like substances produced by endophytic Gram-positive bacteria are associated with coconut palm (*Cocos nucifera* L). In: Rajagopal V, Naresh Kumar S, Upadhyay A, Nirali V (eds) National Seminar on Recent Advances in Plant Biology, 3–5 February 2000, Central Plantation Crops Research Institute, Kasaragod, India. Central Plantation Crops Research Institute, Kasaragod, pp 141–142
- Puente ME, Holguin G, Glick BR, Bashan Y (1999) Root-surface colonization of black mangrove seedlings by *Azospirillum halofraferens* and *Azospirillum brasilense* in seawater. *FEMS Microbiol Ecol* 29:283–292
- Russo A, Moenne-Loccoz Y, Fedi S, Higgins P, Fenton A, Dowling DN, O'Reagan M, O'Gara F (1996) Improved delivery of biocontrol *Pseudomonas* and their antifungal metabolites using alginate polymers. *Appl Microbiol Biotechnol* 44:546–549
- Sadasivan L, Neyra CA (1985) Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation. *J Bacteriol* 163:716–723
- Smidsrod O, Skjak-Braek G (1990) Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol* 8:71–78
- Smith RS (1992) Legume inoculant formulation and application. *Can J Microbiol* 38:485–492
- Stormo KE, Crawford RL (1992) Preparation of encapsulated microbial cells for environmental application. *Appl Environ Microbiol* 58:727–730
- Sun Y, Furusaki S, Yamauchi A, Ichimura K (1989) Diffusivity of oxygen into carriers entrapping whole cells. *Biotechnol Bioeng* 34:55–58
- Thompson JA (1980) Production and quality control of legume inoculants. In: Begerson FJ (ed) Methods for evaluating biological nitrogen fixation. Wiley, New York, pp 489–533
- Trevors JT, Elsas JD van, Lee H, Overbeek LS van (1992) Use of alginate and other carriers for encapsulation of microbial cells for use in soil. *Microbial Releases* 1:61–69
- Vassilev N, Toro M, Vassileva M, Azcon R, Barea JM (1997) Rock phosphate solubilization by immobilized cells of *Enterobacter* sp. in fermentation and soil conditions. *Biores Technol* 61:29–32
- Walker HL, Connick WJ Jr (1983) Sodium alginate for production and formulation of mycoherbicides. *Weed Sci* 31:333–338
- Wan LSC, Heng PWS, Chia CGH (1992) Spray-drying as a process for microencapsulation and the effect of different coating polymers. *Drug Develop Ind Pharm* 18:997–1011

INFORME FINANCIERO

FP-V-2002-1-A-35



CONTENIDO DEL INFORME FINANCIERO

PROGRAMA DE FORMACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

1. Antecedentes Generales de la Propuesta

Nombre : Fernando Borie B..

Código: FP-V-2002-1-A-35

Entidad Responsable o Postulante Individual: Universidad de La Frontera, Temuco

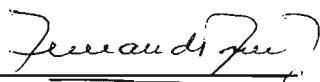
Coordinador

Lugar de Formación (País, Región, Ciudad, Localidad), Bangkok, Tailandia

Tipo o modalidad de Formación: Actividad de Formación: Participación en el 17th Congreso de Mundial de la Ciencia del Suelo

Fecha de realización: 14-21 Agosto de 2002

Fecha: 4 Diciembre de 2002_____

Nombre y Firma coordinador de la ejecución: 

AÑO 2001

Cuadro N° 1

Programado Real

I T E M	Aporte FIA		Aporte CONTRAPARTE		Total		Saldo	Variación
	Programado	Gasto	Programado	Gasto	Programado	Gasto		
	Fecha Programa	Fecha Programa	Fecha Programa	Fecha Programa	Fecha Programa	Fecha Programa		
Pasajes Aéreos Internacionales			1.260.000		1.260.000	-	1.260.000	100,00%
Pasajes Aéreos Nacionales	64.000	64.000			64.000	64.000	-	0,00%
Tasas de Embarque					-	-	-	0,00%
Seguro de Viaje	56.000	56.000			56.000	56.000	-	0,00%
Pasajes Terrestres Internacionales					-	-	-	0,00%
Pasajes Terrestres Nacionales					-	-	-	0,00%
Alojamiento	343.000	315.000			343.000	315.000	28.000	8,16%
Viático Alimentación y Movilización	196.000	196.000			196.000	196.000	-	0,00%
Matrícula o Costo de la Actividad de Formación	294.000	294.000			294.000	294.000	-	0,00%
Materiales de Trabajos y Libros	37.000	43.000			37.000	43.000	(6.000)	-16,22%
Material de Difusión					-	-	-	0,00%
Gastos Emisión Garantía					-	-	-	0,00%
TOTALES \$	990.000	968.000	1.260.000	-	2.250.000	968.000	1.282.000	56,98%
	44,00%		56,00%					

Aportes

FIA -
CONTRAPARTE -

Total → -

Gastos Rendidos

FIA 968.000 ==> 100,00 %
CONTRAPARTE - ==> 0,00 %

Total → 968.000

Gastos Aceptado

FIA 425.920 ==> 44,00 %
CONTRAPARTE 542.080 ==> 56,00 %

Total → 968.000

Situación Fondos Comprometidos

Costo Total Actividad de Formación \$ 968.000
Compra Pasajes Seguros y Tasas \$ 0
Aporte Efectivo a la Contraparte \$ 0
Total Entregado a la Contraparte \$ 0
Total Gastos Efectivos \$ 968.000

Aporte Entregado al Participante	\$ 0
Gasto Máximo FIA Aceptado	(\$ 425.920)
Saldo a Favor del FIA	(\$ 425.920)
Devolución de parte del Participante	\$ 0
Saldo Final	(\$ 425.920)

44,00% Porcentaje Programado según Contrato

CUADRO N° 2
DETALLE DE GASTOS APORTES FIA

Item	Detalle	Fecha	N° Comprobante	Monto Moneda Extranjera	Tipo de Cambio	Monto en \$ Chilenos
Pasajes aéreos nacionales	Tco.-Stgo.-Tco.	Ago.-02	Rendido			64.000
Seguro de viaje			Rendido			56.000
Alojamiento	Hotel Rembrandt	21-Ago.	62746	U\$ 420	750	315.000
Viático Alimentación y Movilización						196.000
Matrícula de costo	Matricula	7.Ago.02	472	U\$ 420	700	294.000
Libros	Fund. Of Soil Ecol.			U\$ 60.83	710	43.000
	Huerto Orgánico					
TOTAL \$						968.000

CUADRO N° 3

DETALLE DE GASTOS APORTES CONTRAPARTE

Item	Detalle	Fecha	N° Comprobante	Monto Moneda Extranjera	Tipo de Cambio	Monto en \$ Chilenos
Pasajes aéreos internacionales	Stgo.-Bangkok-Stgo.	Ago.-02				1.260.000
TOTAL \$						1.260.000

Detalle Gastos CONTRAPARTE



Estado de Cuenta Internacional al 04/09/2002

Banco de Chile

NUMERO DE TARJETA	CUPO TOTAL US\$	CUPO DISPONIBLE US\$
4966 7001 2540 8590	5.000,00	2.988,46
FECHA FACTURACION ANTERIOR	ABONO US\$	
05/08/2002	0,00	
SALDO ANTERIOR FACTURADO	TRASPASO A DEUDA NACIONAL	
0,00	0,00	



026748 N04090204 012 0131 479320700 1242

SR.(A)

FERNANDO R. BORIE

LOS URALES 01705

9320700 TEMUCO



CONSIDERAMOS APROBADO ESTE ESTADO DE CUENTA, SI DENTRO DE 45 DIAS, NO HEMOS RECIBIDO AVISO POR ESCRITO EN CONTRARIO

MOVIMIENTOS DEL PERÍODO

Nº Documento	Fecha	Descripción	Ciudad	País	Monto Moneda Origen	Monto US\$
0708 74548522218430000206569	03/08	THE 17 TH WCSS 5965	CHATUCHAK BK	TH	500,00	500,00
1208 74929002223008079383009	10/08	ROYAL NATIONAL HOT 7011	LONDON WC1	GB	85,00	130,68
2308 74988212235080002220623	22/08	BRITISH AIR 1252705 3005	BANGKOK	TH	3.245,00	77,84
2308 74988212235080002220706	22/08	BRITISH AIR 1252705 3005	BANGKOK	TH	4.205,00	100,87
2608 74548522234125693264012	21/08	PLAZA REMBRANDT CO. 7011	BANGKOK	TH	14.213,78	339,50
2608 74940002236018288538574	24/08	MANACOR				

Inscripción \$ 420.
1 día hotel 80
500.

Total Hotel Rembrandt 339,50
+ 80.
\$ 419,50

CUPON DE PAGO INTERNACIONAL

NOMBRE
FERNANDO R. BORIE

NUMERO DE TARJETA
4966 7001 2540 8590

CANCELAR HASTA
16/09/2002

DEUDA TOTAL US\$
2.011,54

MONTO CANCELADO US\$

NUMERO DE TARJETA
4966 7001 2540 8590

CANCELAR HASTA
16/09/2002

MONTO CANCELADO US\$

INCO

Banco de Chile

Timbre Banco

Efectivo

Cheque

ente

Timbre Banco

เลขประจำตัวผู้เสียภาษีอากร
3101862065



REMBRANDT HOTEL CORPORATION CO., LTD.
บริษัท แรมแบรนต์ โฮเทล คอร์ปอเรชั่น จำกัด
19 ซอยสุขุมวิท 18 ถ.สุขุมวิท เขตคลองเตย
กทม. 10110 โทร. 0 2261 7100
แฟกซ์ 0 2259 5414

เล่มที่ 1255

ใบเสร็จรับเงิน และ ใบกำกับภาษี
RECEIPT AND TAX INVOICE

เลขที่ 62746

ได้รับเงินจาก MR. FERNANDO BORJE.
Received From LOS URALES CASILLA 54-3
TEMUCO, 01705 OTHERS EUROPE.

อัตราภาษี 7 %
Tax Rate

วันที่ 21/08/02
Date

ชำระค่า PAYMENT OF	จำนวน (บาท) THE SUM OF (BAHT)
Accommodation + OTHERS.	27,886.14
VISA CARD 4966 7001 2540 8890	
05/05.	
CREDIT CARD	
ภาษีมูลค่าเพิ่ม / V.A.T	1,824.33
มูลค่าหลังหักภาษี / VATABLE AMOUNT	26,061.81
มูลค่าที่ต้องชำระสุทธิ / NET PAYMENT	27,886.14

TWENTY-SEVEN THOUSAND AND EIGHT HUNDRED EIGHTY-SIX BAHT AND THIRTY-THREE SATANGS.

การชำระด้วยเช็คจะสมบูรณ์ต่อเมื่อได้เรียกเก็บเงินตามเช็คเรียบร้อยแล้ว
PAYMENT BY CHEQUE, SUBJECT TO CHEQUE REALISATION

☐ เงินสด
Cash

☐ เช็คธนาคาร
Cheque

สาขา
Bank/Branch

เลขที่
Cheque No.

วันที่
Date

ผู้รับเงิน / COLLECTOR

ผู้ได้รับมอบอำนาจ / AUTHORIZED SIGNATORY

ใบเสร็จรับเงินที่ถูกต้อง จะต้องมียกยเซ็นของผู้รับเงินและผู้ได้รับมอบอำนาจ
RECEIPT NOT VALID UNLESS SIGNED BY COLLECTOR AND AUTHORIZED SIGNATORY

Rembrandt Hotel Corporation Ltd.
 19 Soi Sukhumvit 18 Sukhumvit Road
 Bangkok 10110 Thailand
 Tel : (662) 261 7100
 Fax : (662) 261 7017
 Home page : www.rembrandtbkk.com
 E-mail : reservations@rembrandtbkk.com
 Vat No: 3 10 1 86206 5



**REMBRANDT
 HOTEL**
 BANGKOK

Ref No. 512972

****INFORMATION BILL****

GUEST FOLIO

Room No. : 2013
 Folio No.:

MR. FERNANDO BORIE
 LOS BRALES CASILLA 54-3
 PERUCO, 01705
 OTHERS EUROPE
 TEMUCO

Arrival: 13/08/02

Departure: 21/08/02

No. of Persons 2

Rembrandt Hotel, Bangkok, 21/08/02 12:52:23 CHULEEKORN
 OWN A/C RM@USD75++/RATE 42.10 BAHT

DATE VOU.NO. DESCRIPTION AMOUNT BALANCE

13/08		Accommodation	3716.59	3716.59
14/08		Accommodation	3716.59	7433.18
14/08	2560	Laundry 2013 MR. COSIO GONZALEZ	447.26	7880.44
15/08		Accommodation	3716.59	11597.03
16/08		Accommodation	3716.59	15313.62
16/08		City Ledger	-3329.60	11984.02
17/08		Accommodation	3716.59	15700.61
18/08		Accommodation	3716.59	19417.20
19/08		Accommodation	3716.59	23133.79
19/08	2687	Dry Cleaning	564.96	23698.75
20/08		Accommodation	3716.59	27415.34
20/08	402	Pool bar #2013 : CHECK # 186	470.80	27886.14

Total 27886.14 Bht

Vatable Amount 29173.59 Bht
 V.A.T 2042.15 Bht
 Non-Vatable 0.00 Bht
 Total 31215.74 Bht

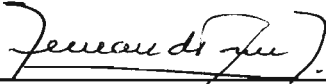
CREDIT CARD

I agree that my liability is not waived and agree to be held personally liable in the event that the indicated person, company or association fails to pay for any part or the full amount of these charges.

GUEST ' S SIGNATURE _____

RECIBO SIMPLE

Yo, Fernando Borie Borie _____, RUT
N°4.826.143-4 _____, recibí de FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA (FIA) _____, Entidad
Responsable de la propuesta Código FP-V-2002-1-A-35, la suma
de \$ 196.000- _____ por concepto de viáticos (alimentación y
traslados menores) entre las siguientes fechas: 14-21 de Agosto de 2002__

Firma receptor: 

RUT: 4.826143-4 _____

V°B y Timbre Entidad Responsable: _____

Fecha: 4 de Diciembre de 2002 _____



17 th World Congress of Soil Science
14-21 August 2002, Bangkok, Thailand

NO 00472

SOIL AND FERTILIZER SOCIETY OF THAILAND
Department of Soils, Faculty of Agriculture
Kasetsart University, Bangkok 10903, Thailand

REG. NO. 10986

DATE 07/08/2002

RECEIVED FROM Mr. FERNANDO BORIE

ORGANIZATION UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA , P.O.BOX 54-D

ADDRESS UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA , P.O.BOX 54-D

CITY TEMUCO POSTAL CODE _____ COUNTRY CHILE

NO	DESCRIPTION	QUANTITY	UNIT PRICE	TOTAL
1	IUSS Member	1	420.00	420.00
2	Non-Member			
3	Young Scientist			
4	Accompanying Person (s)			
5	Gala Dinner			
				420.00

RECEIVED BY BE

DATE 14 Aug. 02



ELSEVIER SCIENCE EXHIBITION ORDER FORM

MEETING: WCSS Country Thailand Exh. Code: _____

BOOKS			Currency:			
Qty	ISBN	Author/Title	Taken From Stand	Please Send	List Price	Conf. Price
1	0121797352	Coleman, Fundamentals of Soil Ecology	X			44.70
			VAT at %		Total	44.70

ELECTRONIC PRODUCTS ON - LINE / FLOPPY DISK			Currency:		
Qty	ISBN	Author/Title	Taken From Stand	Please Send	List Price
			VAT at %		Total

Technical Details

- ☐ on-line
☐ Floppy disk ➔ Platform: ☐ MS-Windows ☐ Macintosh
 ➔ Version ☐ Teacher ☐ Student single
☐ Package (combined paper and electronic version) ☐ Student set

ELECTRONIC PRODUCTS CD-ROM / CD-I			Currency:		
Qty	ISBN	Author/Title	Taken From Stand	Please Send	List Price
			VAT at %		Total

Technical Details

- ☐ CD-ROM ➔ Platform: ☐ MS-Windows ☐ NTSC
☐ CD-i ➔ Version ☐ PAL

JOURNALS			Currency:	
ISSN	Start Month	Journal Title	Please Send	List Price

Prepaid orders are despatched post free

Customers in the European Union should add the appropriate VAT rate applicable in their country to the price

- ☐ Please invoice and add postage and handling

- ☒ Cash ☐ Cheque ☐ Credit Card ☐ American Express
☐ Visa ☐ Mastercard/Eurocard

VAT at % _____ Total _____
Payment Total: _____ Currency Amount 44.70

Valid Until ☐ ☐ ☐ ☐
Month Year

Credit card slip attached (if applicable)

Name _____ Organisation _____
Dept. _____ Address _____

Post/Zip Code _____ Country _____

E-Mail No. _____ Tel. No. _____

Order Taken By Mariska J. van Date 20.8.2002

51704229 3 00110 5039396 250802/18:24

91065 EL CULTIVO B 1 A 11,95

23/00294555-000

91065 EL HUERTO OR 1 A 4,18

08/10401091-000

SUBTOTAL 16,13

(*) TOTAL 16,13

EFFECTIVO 20,00

CAMBIO 3,87

COBRADO 16,13

(*) 2684 PTA D/ 0,00

A 4/ 16,13 B 7/ 0,00 C16/ 0,00

0310 00

GRACIAS POR SU VISITA - PRECIADOS

David C. Coleman
D. A. Crossley, Jr.

Fundamentals of
**Soil
Ecology**





Fausta Mainardi Fazio

EL CULTIVO BIOLÓGICO

de hortalizas y frutales

cómo acabar con los parásitos y las enfermedades
del huerto, mantener la fertilidad de la tierra,
obtener productos superiores desde el punto
de vista nutricional respetando la naturaleza,
sin emplear sustancias tóxicas o contaminantes



EDITORIAL DE VECCHI

El cultivo biológico de hortalizas y frutales

- * Los fertilizantes naturales, el compost, el abono en verde
- * La defensa biológica de los cultivos y el control de las malas hierbas. Los fitosanitarios naturales
- * Las normas generales para la programación del huerto y del vergel. La forma natural de regar
- * Las necesidades de las hortalizas de raíz, de bulbo, de tubérculo, de flor, de tallo, de fruto y de semilla
- * En las fichas de cada hortaliza encontrará fácilmente las características de cada especie: el calendario de siembra, trasplante y recolección, las técnicas aplicables, la temperatura óptima de cultivo y muchos consejos. En total se incluyen más de 50 especies, hortalizas y frutales
- * Tablas, dibujos e ilustraciones didácticas le ayudarán a aprender la forma de obtener los mejores productos biológicos

Fausta Mainardi Fazio, licenciada en ciencias agrarias en la Universidad de Milán, se dedica desde hace años a la divulgación científica en el ámbito de las nuevas técnicas de cultivo y a la experimentación.

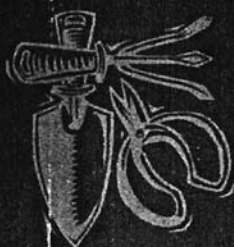
ISBN 84-315-2103-1



9 788431 521035



T U J A R D Í N

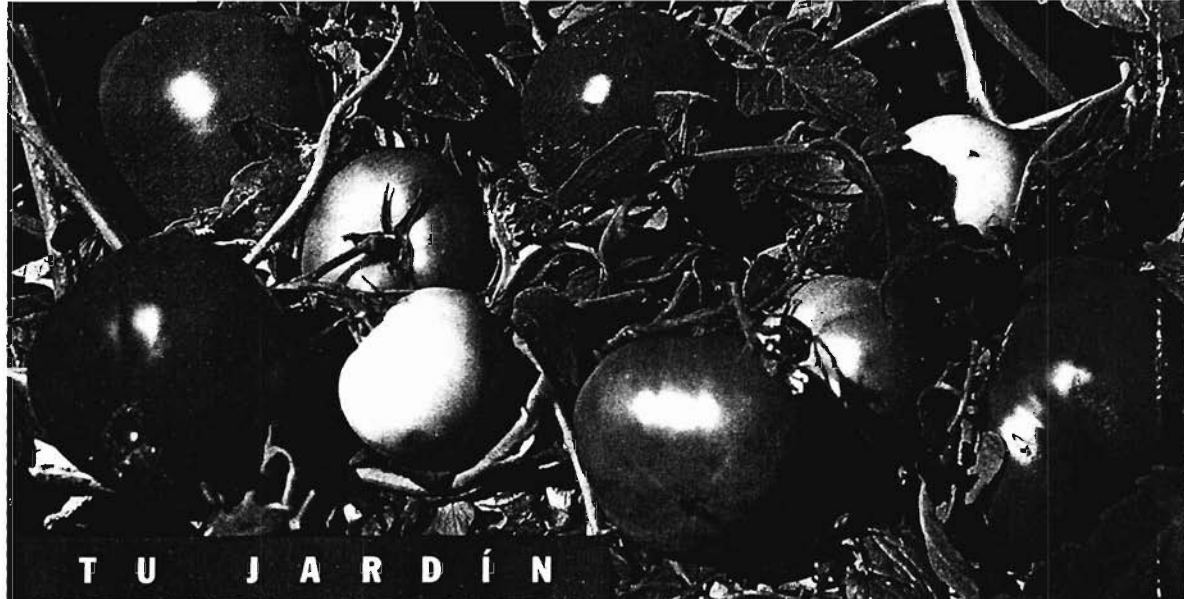


EL HUERTO ORGÁNICO



susaeta





T U J A R D Í N



Crear un jardín en el escaso espacio de un piso, conocer las especies idóneas para su buerto, obtener la mejor cosecha de sus frutales, mantener un bonsái... La jardinería y sus trucos en una colección enfocada a las características climatológicas de cada zona de nuestro país y que abarca el jardín práctico y el jardín creativo.

P.V.P.:

4,18 €



susaeta
ediciones sa

Campezo, s/n - 28022 Madrid
Tel.: 913 009 100 - Fax: 913 009 118
Impreso en España
ediciones.susaeta@nexo.es

No está permitida la reproducción del contenido de este libro, ni su tratamiento informático.

© SUSAETA EDICIONES, S.A.

Diseño de cubierta: Paniagua&Calleja

D.L.: M-17336-2000
ISBN 84-305-9522-8



9 788430 595228

Ref. 758-9