EXCALIBUR

DESVELANDO LOS SECRETOS DE LA NATURALEZA:
La transformación de la producción agrícola mediante microorganismos beneficiosos

Este proyecto ha recibido financiación del programa de investigación e Innovación Horizonte 2020 de la Unión Europea en virtud del acuerdo de subvención nº 817946.

Contenido

Introducción 4

Capítulo 1. Hongos micorrícicos para mejorar la eficacia de absorción y el crecimiento de los cultivos hortícolas 6

1. Tipos de hongos micorrícicos y su capacidad para colonizar las plantas 6

2. Efecto de los HMA en el crecimiento de las plantas, el rendimiento y la tolerancia al estrés..... 10

3. Formulaciones y directrices de aplicación a diferentes sistemas de cultivo hortícola 12

4. Gestión de los cultivos para aprovechar mejor la actividad de los HMA proponiendo prácticas de gestión que aumenten la eficacia de los HMA en el crecimiento y el rendimiento de los cultivos. 14

Capítulo 2. Productos microbianos para el biocontrol de los cultivos hortícolas 18

1. Usos de microorganismos para el biocontrol 18

2. Biocontrol de plagas y patógenos del suelo: factores a tener en cuenta para lograr una alta eficacia.. 21

3. Biocontrol de plagas y patógenos que afectan a los órganos vegetales aéreos: aspectos prácticos 25

4. Capacidad multifuncional de los microorganismos: una oportunidad para la gestión integrada de plagas 30

Capítulo 3. Microorganismos promotores del crecimiento vegetal 35

1. Microorganismos capaces de favorecer el crecimiento de las plantas 35

1.1. Modo de acción: ¿cómo promueven los microorganismos el crecimiento de las plantas? 36

1.2. Cepas comerciales de PGPM: de la investigación a la aplicación 38

2. Aprovechamiento de los prebióticos, probióticos y postbióticos para promover el crecimiento de las plantas y mejorar la fertilidad y la salud del suelo. 41

2.1. ¿Cómo seleccionar un prebiótico, probiótico o postbiótico beneficioso para las plantas?..... 42

3. Aspectos prácticos para la correcta aplicación de microorganismos promotores del crecimiento vegetal 43

Capítulo 4. Tecnología de producción de productos microbiológicos 49

1. Tipos de formulación (en un contexto práctico: para qué, cuáles utilizamos y por qué). 49

2. Tecnología de fabricación de productos microbianos 50

2.1. Selección y aislamiento de microorganismos 51

2.2. Almacenamiento 53

2.3. Inóculo 54

2.4. Medios de cultivo 55

2.5. Componentes clave de la línea de producción 56

2.6. Tecnología de producción de biopreparados 57

2.7. Seguimiento y control de las variables que afectan al crecimiento microbiano y al control de calidad . 59
2.8. Consideraciones higiénicas para toda la línea 61
3. Eficacia biológica y comercialización 61
3.1. Verificación de la eficacia biológica en condiciones de laboratorio 61
3.2. Verificación de la eficacia biológica en condiciones controladas 63
3.3. Verificación de la eficacia biológica en condiciones de campo 63
3.4. Solubilidad, miscibilidad y estabilidad de los biopreparados 64

Introducción

Se ha demostrado que los microorganismos y sus comunidades desempeñan un papel fundamental en la diversificación y el funcionamiento de todos los demás organismos vivos. Se sabe que la interacción entre plantas y microorganismos influye en la capacidad de la planta para hacer frente al estrés abiótico y biótico, con importantes implicaciones para la producción vegetal. Gracias a este conocimiento, en los últimos 20-30 años se ha aislado, caracterizado y probado un gran número de microorganismos como biofertilizantes y agentes de biocontrol. Los resultados confirmaron el efecto beneficioso de los microorganismos seleccionados sobre el crecimiento y la salud de las plantas, repercutiendo también positivamente en las propiedades del suelo.

El uso de microorganismos beneficiosos en la producción de cultivos se está convirtiendo así en una práctica común, ya que los productos de base microbiana se reconocen como alternativas o complementos potenciales a los fertilizantes y plaguicidas sintéticos, en particular en una agricultura moderna y sostenible y en el contexto de las preocupaciones medioambientales y climáticas. A este respecto, cabe señalar que, a escala de la UE, los productos de origen microbiano están regulados por el Reglamento (CE) nº 2019/1009 relativo a los productos fertilizantes o por el Reglamento (CE) nº 1107/2009 relativo a la comercialización de productos fitosanitarios.

Los productos a base de microorganismos utilizados para la nutrición de las plantas, denominados por la legislación de la UE "bioestimulantes microbianos", son un medio eficaz para fomentar el crecimiento y la producción de las plantas en un contexto en el que se reduce el uso de fertilizantes minerales o sintéticos. Los bioestimulantes microbianos son productos que estimulan los procesos de nutrición vegetal independientemente del contenido en nutrientes del producto, con el único objetivo de mejorar una o varias de las siguientes características de la planta o la rizosfera: eficiencia en el uso de nutrientes, tolerancia al estrés abiótico, características de calidad, disponibilidad de nutrientes confinados en el suelo o la rizosfera. Entre los bioestimulantes microbianos, cuatro grupos de microorganismos figuran actualmente entre los productos fertilizantes: tres bacterias fijadoras del nitrógeno atmosférico (*Azotobacter* spp., *Rhizobium* spp., *Azospirillum* spp.) y los hongos micorrícicos, que favorecen principalmente la nutrición fosfatada, pero también pueden contribuir a mejorar la nutrición nitrogenada y de oligoelementos.

En cambio, los productos fitosanitarios basados en microorganismos se consideran similares a los sintéticos y, para ser registrados, deben controlar eficazmente la plaga objetivo. Cuando se considera el control de insectos, los hongos entomopatógenos son el grupo de microorganismos que ha proporcionado las soluciones más útiles. Entre las principales especies utilizadas para este fin se encuentran *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartti*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea*. En el caso de los biofungicidas, se dispone de formulaciones microbianas para usos tanto previos como posteriores a la cosecha. Sin embargo, también en este caso, la multitud de especies y cepas conocidas por su actividad de biocontrol no se corresponde con el limitado número de microorganismos registrados como sustancias activas.

Aunque hasta ahora se han aplicado con éxito productos de origen microbiano en la agricultura, los agricultores siguen mostrándose reacios a aplicarlos de forma generalizada. Esto se debe al escaso conocimiento sobre el impacto que los métodos de aplicación y las prácticas de gestión de cultivos pueden tener en la eficacia de los productos microbianos. Los conocimientos para la aplicación sobre el terreno son

limitados en cuanto a los requisitos de dosificación o las interacciones específicas del bioinoculante con la biota nativa del suelo. Además, un análisis reciente de los productos presentes en el mercado a escala mundial ha puesto de relieve la necesidad de un desarrollo integrado de los productos de base microbiana, incluidos sus procesos de producción y formulación, en particular para el posible uso de aditivos que puedan aumentar la vida útil o la eficacia de los productos. Desde este punto de vista, la formulación del bioestimulante microbiano es un factor clave para garantizar la eficacia del tratamiento del cultivo. En efecto, mientras que la formulación de productos basados en una sola cepa o especie simplifica el proceso de producción y registro para su comercialización, diversos estudios indican la utilidad de aplicar consorcios de microorganismos compuestos por especies capaces de "colaborar" entre sí y posiblemente también con el microbioma del suelo. En este sentido, los consorcios de hongos micorrícicos y bacterias han demostrado ser especialmente eficaces en diversos cultivos, permitiendo reducir la aplicación de fertilizantes minerales hasta en un 50%.

Junto con la búsqueda de la mejor formulación por parte de la industria, una contribución crucial para garantizar el éxito del tratamiento con un bioestimulante microbiano o un plaguicida debe correr a cargo de los propios agricultores, mediante la adopción de prácticas agronómicas que no afecten negativamente a la acción del propio producto. De hecho, la persistencia o eficacia de los bioestimulantes y plaguicidas microbianos está generalmente influenciada por las prácticas de gestión agrícola: prácticas como el laboreo, la gestión de plagas con otros medios, la fertilización mineral y orgánica o el régimen hídrico pueden modificar en gran medida la eficacia de un producto microbiano. En el caso de la gestión de la fertilización, considerando que, en general, el 60-90% de los fertilizantes minerales aplicados son arrastrados por el agua y que sólo el 30-50% de los fertilizantes nitrogenados y el 10-45% de los fertilizantes fosfatados aplicados son absorbidos por los cultivos, la aplicación de bioestimulantes microbianos puede favorecer un sistema integrado de gestión de la fertilización, apoyando la productividad agrícola con un bajo impacto ambiental. En el caso de los pesticidas microbianos, la dosis y las condiciones ambientales en el momento de la aplicación del producto también son factores importantes que afectan a su eficacia.

Todos los aspectos mencionados han sido explicados con detalle, pero con un enfoque práctico y fácilmente comprensible, en los capítulos de este libro. El libro ha sido concebido como un esfuerzo para favorecer la transferencia de los conocimientos adquiridos dentro del proyecto EXCALIBUR, que ha sido financiado por la UE dentro del programa de investigación Horizonte 2020, y otros proyectos sobre este tema. Es la esperanza de los autores que tal esfuerzo fomente la reducción del uso de insumos químicos a través de una aplicación razonada de productos de base microbiana entre los agricultores y otros profesionales, para evitar cualquier impacto negativo en la productividad de los cultivos. En cambio, un uso tan meditado afectaría positivamente al medio ambiente y a la salud animal y humana, cuya interrelación está sobradamente demostrada.

Prof. Dr. hab. Eligio Malusà y Dr. Krzysztof Ambroziak

Capítulo 1. Hongos micorrícicos para mejorar la eficacia de absorción y el crecimiento de los cultivos hortícolas

Lidia Sas-Paszt[1], Sławomir Głuszek[1], Beata Sumorok[1], Edyta Derkowska[1], Anna Lisek[1], Louisa Robinson Boyer[2], Maria Grazia Tommasini[3]

[1]Instituto Nacional de Investigación Hortícola, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, POLONIA
[2]NIAB, East Malling, West Malling, Kent, ME19 6BD, REINO UNIDO
[3]RI.NOVA, via dell'Arrigoni 120, 47522 Cesena - FC, ITALIA

El objetivo de este capítulo es presentar los hongos micorrícicos y promover un mejor conocimiento de estos hongos y de su potencial para mejorar los sistemas de producción hortícola. También se describe cómo o cuándo es más apropiado utilizar estos microorganismos beneficiosos, así como las condiciones o prácticas que pueden limitar sus efectos beneficiosos.

1. Tipos de hongos micorrícicos y su capacidad para colonizar las plantas

Existen cuatro tipos principales de hongos micorrícicos. Se trata de las ectomicorrizas, las micorrizas arbusculares, las micorrizas ericoides y las micorrizas orquídeas. Las ectomicorrizas están asociadas a muchas especies arbóreas, forman estructuras enrolladas dentro de las raíces y suelen ser específicas de un hospedador, favoreciendo cada una a una especie concreta. Las micorrizas ericoides se asocian únicamente con plantas ericáceas como el arándano y el arándano rojo, y las micorrizas orquidáceas con sus huéspedes orquídeas. En este capítulo nos centraremos en los hongos micorrícicos arbusculares (HMA). Los HMA son ubicuos y se encuentran en todos los rincones del planeta y en todos los ambientes terrestres.

Los hongos micorrícicos arbusculares están representados por unas doscientas cincuenta especies pertenecientes a la división Glomeromycota dividida en cuatro órdenes (Archaeosporales, Diversisporales, Glomerales y Paraglomerales), que incluyen un total de 11 familias. Los HMA se consideran uno de los factores responsables del éxito de la colonización de la tierra por las plantas primarias, y tienen un registro fósil que se remonta a 450 millones de años. Entran en simbiosis con casi el 80 por ciento de las especies de plantas terrestres que se encuentran en la Tierra, lo que incluye muchos de los cultivos alimentarios mundiales, aunque es importante señalar que los HMA no forman asociaciones con las *Brassicacea*.

Los hongos micorrícicos se consideran organismos asexuales, se reproducen formando grandes esporas, en los extremos de las hifas que se extienden por el suelo. En presencia de una planta viva las esporas son capaces de germinar. El micelio coloniza las raíces de las plantas y les transfiere agua y nutrientes a cambio de carbono. Como hay beneficios tanto para el hongo como para la planta, esta relación es una simbiosis mutua (Smith y Read 2008).

Cuando las hifas de los HMA entran en contacto con la raíz de una planta, forman apresorios en su superficie, donde los hongos liberan señales químicas a la planta para que les permita entrar en la corteza. Una vez dentro de la raíz, el micelio suele formar espirales intracelulares y luego se extiende creciendo dentro de las células corticales primarias. Dentro de las células corticales de la planta, las ramificaciones del micelio forman estructuras denominadas arbúsculos (Fig. 1.1). Es a través de estos arbúsculos como se produce la transferencia de agua y nutrientes entre la planta y el hongo y de donde procede el nombre de este tipo de micorriza. En la raíz, algunas especies también pueden formar vesículas que realizan funciones de

almacenamiento, y las sustancias orgánicas contenidas en ellas son utilizadas por los hongos durante los periodos de baja actividad metabólica de las plantas huésped.

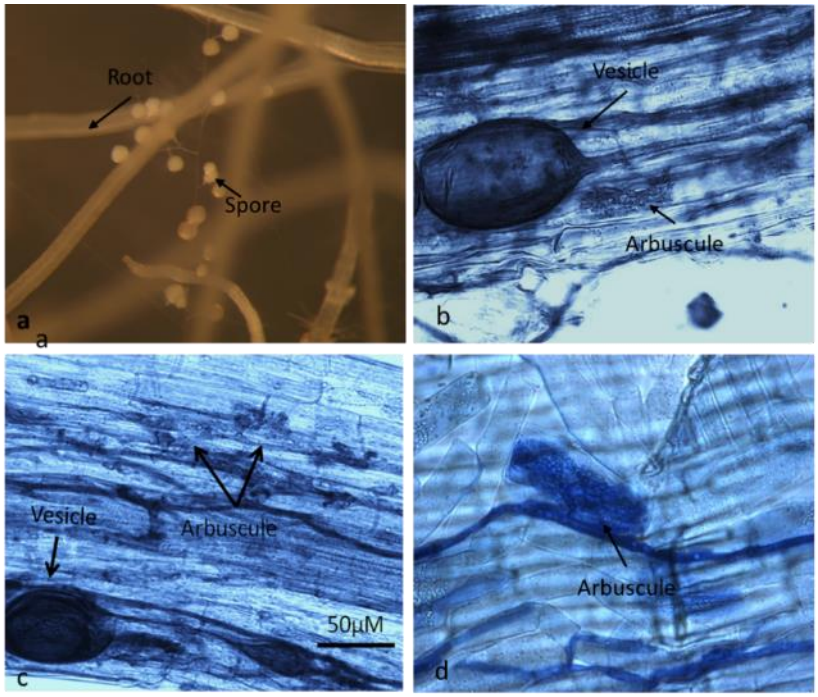

Fig. 1.1. Foto de AMF. Cultivo de órgano radicular mostrando hifas radiculares y esporas, raíces de fresa teñidas con azul tripán mostrando células radiculares, hifas, vesículas y arbúsculos.
Autor: Louisa Robinson Boyer

Debido a la necesidad de reducir los insumos químicos en la agricultura por las restricciones impuestas a su uso, así como por el aumento de sus costes, los agricultores reclaman soluciones alternativas sostenibles para mantener el rendimiento de los cultivos. Los HMA tienen un gran potencial para ser utilizados en muchas especies de plantas de cultivo que desempeñan un papel importante en la agricultura, incluyendo numerosas especies de árboles frutales, vid, arbustos, fresa, cultivos de hortalizas, ensaladas y plantas ornamentales. Recientemente ha habido un gran interés en el uso de HMA en sistemas comerciales, gracias también a la disponibilidad de dichos inóculos comerciales y a la conocida intervención de buenas prácticas en los sistemas de cultivo para aumentar las poblaciones nativas de microbios del suelo.

Algunas especies de plantas frutales de la familia Ericaceae, por ejemplo, el arándano highbush, el arándano mediano, el arándano bilberry, el arándano lingonberry o el arándano rojo, forman micorrizas ericoides, que son bastante diferentes de los HMA, y en las que las hifas del hongo micorrícico penetran tanto en los espacios intercelulares como en el interior de las células radiculares, creando estructuras en forma de espirales. También se dispone de inóculos comerciales de micorrizas ericoides.

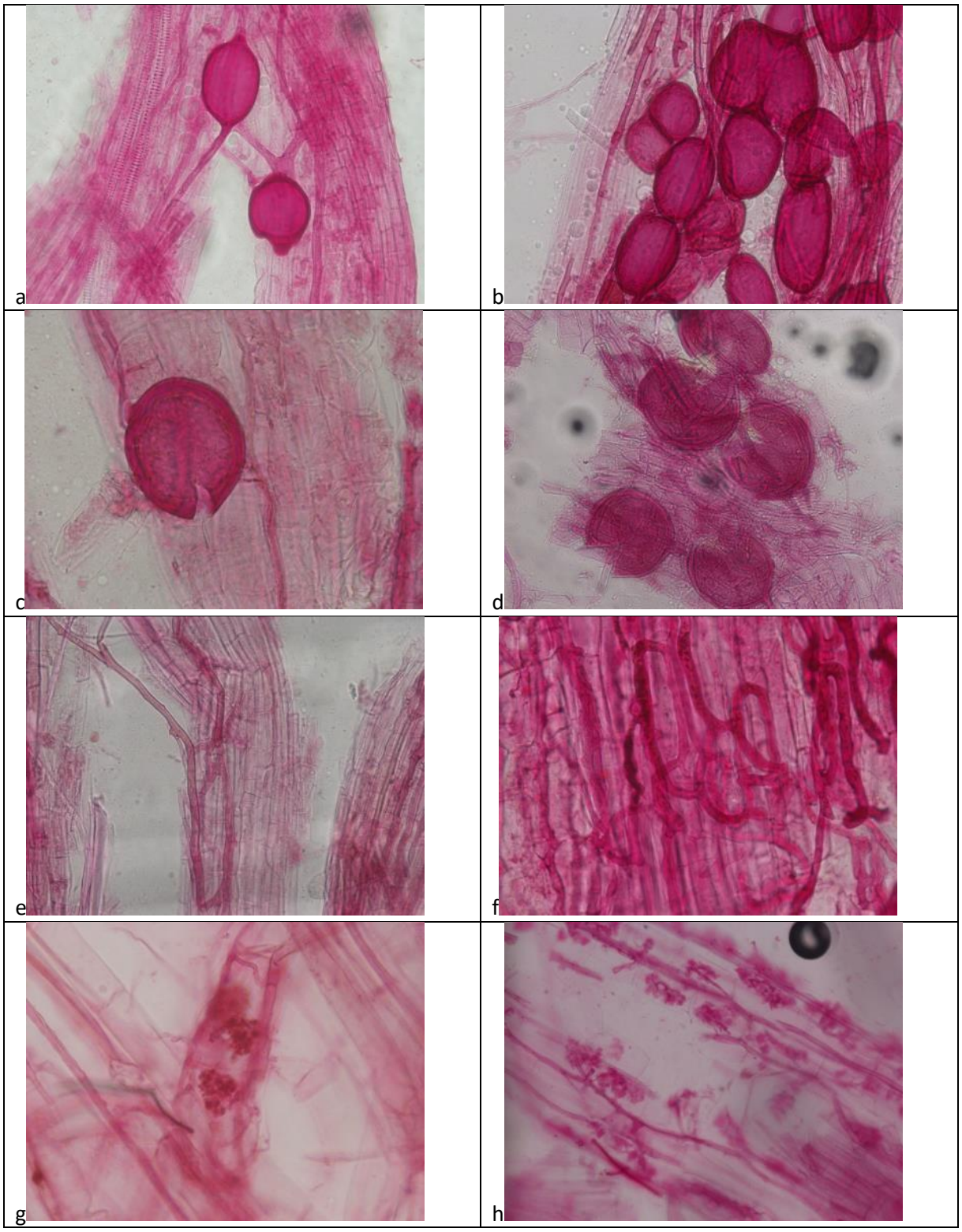

Fig. 1.2. Estructuras de los hongos micorrícicos en las raíces. (a) Vesículas en la raíz de una planta de fresa de control, (b) Vesículas en la raíz de fresa tras inoculación con microorganismos beneficiosos, (c) Espora en la raíz de una planta de fresa de control, (d) Esporas en la raíz de fresa tras inoculación con microorganismos beneficiosos, (e) Micelio de un hongo micorrícico arbuscular en la raíz de una planta de fresa de control, (f) Micelio de un hongo micorrícico arbuscular en la raíz de plantas de fresa tras inoculación con microorganismos beneficiosos, (g) Arbúsculo en la raíz de una planta de fresa de control, (h) Arbúsculos en la raíz de plantas de fresa tras inoculación con microorganismos beneficiosos.

Fuente: Departamento de Microbiología y Rizosfera, Instituto Nacional de Investigación Hortícola de Polonia.

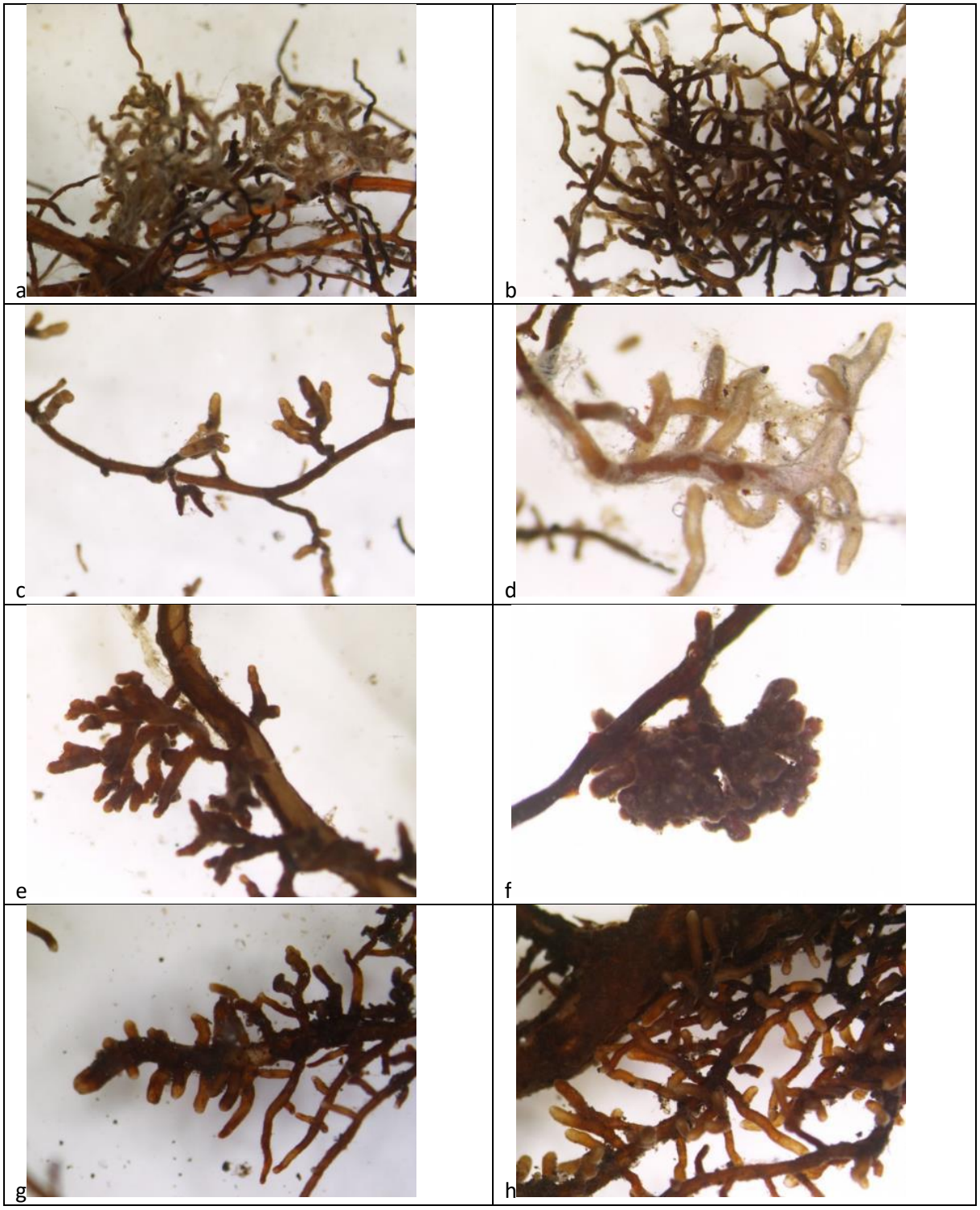

Fig. 1.3. Hongos ectomicorrícicos en las raíces de plantas forestales. (a) Ectomicorrizas en las raíces del haya europea que crece en el vivero forestal de Podanin, (b) Ectomicorrizas en las raíces del abedul plateado que crece en un vivero forestal de Radom, (c) Ectomicorrizas en las raíces del carpe europeo que crece en el vivero forestal de Białogard, (d) Ectomicorrizas en las raíces del roble inglés que crece en el vivero forestal de Białogard, (e) Ectomicorrizas en las raíces del pino silvestre que crece en el vivero forestal de Gościniec, (f) Ectomicorrizas en las raíces del pino silvestre que crece en el vivero forestal de Gościniec, (g) Ectomicorrizas en las raíces de la picea que crece en el vivero forestal de Białogard, (h) Ectomicorrizas en las raíces de la picea que crece en el vivero forestal de Wałcz. Fuente: Departamento de Microbiología y Rizosfera, Instituto Nacional de Investigación Hortícola de Polonia.

2. Efecto de los HMA en el crecimiento de las plantas, el rendimiento y la tolerancia al estrés

La investigación sobre la aplicación práctica de los productos micorrícicos se lleva a cabo desde hace muchos años en varios centros de investigación de todo el mundo. Varios estudios han demostrado los efectos positivos de la inoculación de HMA en el crecimiento de una serie de cultivos hortícolas y plantas modelo. Los HMA tienen el efecto de modificar el crecimiento, la morfología y el número de raíces, haciendo que el sistema radicular de la planta sea más eficiente a la hora de captar agua y compuestos minerales del suelo. En muchos casos, las raíces de las plantas colonizadas por hongos micorrícicos arbusculares están mejor formadas y tienen más raíces laterales.

La simbiosis mutualista con los HMA aporta a las plantas muchos beneficios, el más importante de los cuales, para los agricultores y cultivadores, es el aumento de la absorción de agua y nutrientes y un aumento bastante amplio de la resistencia a diversos estreses ambientales, tanto bióticos, como el ataque de plagas y patógenos, como abióticos, como la sequía, el encharcamiento y el estrés térmico. En particular, es bien sabido que, al mejorar la asunción de agua y nutrición, los HMA benefician el crecimiento de las plantas y, a menudo, su rendimiento. La micorrización también aumenta la superficie foliar y la actividad fotosintética de la planta, lo que facilita su crecimiento.

Los HMA son especialmente importantes para la absorción de fósforo, nitrógeno, potasio, magnesio y microelementos, lo que mejora la salud de las plantas, sobre todo en condiciones deficientes. Una deficiencia de fosfato limita significativamente el crecimiento de las plantas, especialmente porque los iones de fosfato no son muy móviles en el suelo, ya que forman una serie de complejos insolubles que ralentizan su difusión. El micelio externo de los HMA penetra en el suelo en mucha mayor medida que las raíces por sí solas, formando una red hifal que facilita la absorción de agua y compuestos minerales del suelo por las plantas y la liberación de compuestos orgánicos de las raíces al suelo. La red hifal no sólo llega mucho más allá de la zona de absorción de nutrientes de las raíces, proporcionando una mayor superficie de absorción, sino que los finos filamentos hifales pueden penetrar en partículas más pequeñas extrayendo nutrientes inaccesibles, otros compuestos mínimos y agua de bolsas en el suelo (Helgason y Fitter 2005). Marschner y Dell (1994) han demostrado que hasta el 80% del fósforo contenido en las plantas puede ser aportado por hongos de la división Glomeromycota. Se ha demostrado que un uso eficiente del fósforo, incluso bajo condiciones de deficiencia en el suelo, es ayudado por los HMA que secretan enzimas en el suelo que disuelven formas de fósforo que no están disponibles para las plantas. El fósforo en los filamentos se transloca con el movimiento del citoplasma y se presenta en una forma insoluble en agua (polifosfatos), de modo que las bajas concentraciones de fósforo metabólicamente activo permiten su continua absorción desde la solución del suelo. Se ha demostrado que, en suelos pobres en fósforo, la micorriza en plantas de manzano aumenta la eficacia de la absorción de fósforo, mientras que en suelos ricos en fósforo la micorriza facilita la absorción de iones de zinc y cobre. Sin embargo, hay varios estudios que muestran una reducción en el nivel de asociación y dependencia de AMF en situaciones en las que el fósforo es abundante. Niveles muy altos de fósforo suelen tener un efecto negativo en el grado en que las plantas destinan sus recursos a la asociación con los HMA.

Otros elementos y minerales menores clave también son transportados a la planta por los HMA, como el potasio, el zinc, el calcio, el magnesio y el cobre. Se ha demostrado que los ciruelos y cerezos inoculados con

una especie de HMA, *Glomus intraradices*, tenían un efecto beneficioso en el aumento del contenido de micronutrientes de los tejidos vegetales y en el crecimiento de las plantas que crecían en suelos bajos en fósforo. Asimismo, la mejora del crecimiento de vides de distintas variedades resultante de la micorrización está estrechamente relacionada con la absorción de los siguientes minerales del suelo: fósforo, nitrógeno, hierro, cobre y zinc.

Ahora se sabe que los HMA también desempeñan un papel importante en la transferencia de nitrógeno a las plantas, facilitando su absorción del suelo y su asimilación. Los investigadores han observado transportadores en los arbúsculos para el nitrógeno y otros elementos junto con acuaporinas para el agua. Algunas especies de HMA también transportan aminoácidos, como la glicina y la glutamina, desde el suelo hasta las raíces. La siguiente imagen muestra el intercambio de nutrientes.

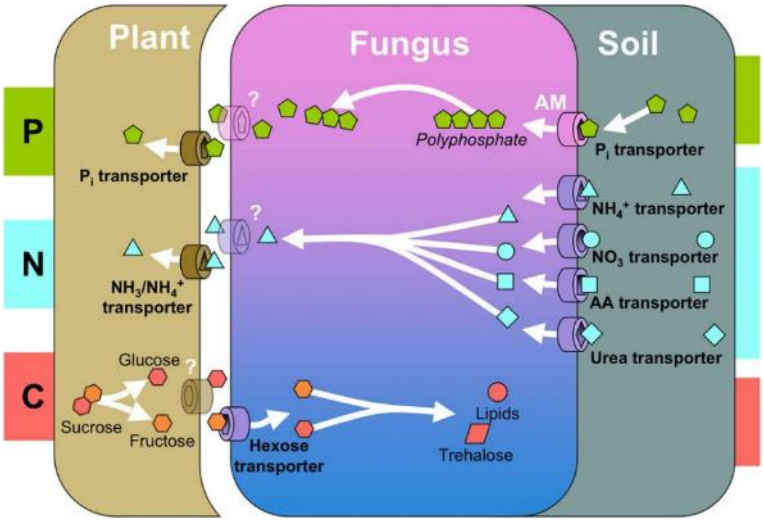

Fig. 1.4. El principal intercambio de nutrientes en HMA de Bonfante y Genre (2010).

En general, los microorganismos beneficiosos influyen directamente en el crecimiento de las plantas mediante la síntesis de reguladores del crecimiento, ácidos orgánicos, sideróforos, formación de biopelículas y acción antagonista contra los patógenos del suelo y de las plantas. Los resultados obtenidos indican un elevado potencial a este respecto tanto para las bacterias como para los hongos beneficiosos de la rizosfera, lo que se traduce en un aumento del rendimiento y una mejora de la calidad del mismo, en comparación con el de las plantas fertilizadas con abonos minerales estándar.

Con el cambio climático global y el aumento de los fenómenos meteorológicos extremos es crucial encontrar mecanismos para aumentar la resistencia de las plantas de cultivo a estas tensiones. Hay muchas pruebas de que los HMA desempeñan un papel importante en la regulación del agua en las plantas y en el aumento, por ejemplo, de la tolerancia de las plantas a la sequía. Se ha descubierto que las raíces de las plantas que crecen en ambientes áridos están intensamente colonizadas por micorrizas y la colonización por HMA de las plantas de cultivo que crecen en estas zonas puede aumentar eficazmente el tamaño y la calidad de los rendimientos de las plantas (Al-Karaki et al. 2004) y la resistencia a los episodios de sequía. Asimismo, cada vez hay más pruebas que demuestran que los HMA pueden ayudar a las plantas a tolerar el encharcamiento (por el aumento de las precipitaciones y el estrés térmico).

Se ha demostrado que la dinámica de los HMA cambia en las raíces en función del estrés y de los efectos estacionales. Por ejemplo, el grado de colonización de las raíces de las vides (Pinot Noir) que crecían en un viñedo de 20 años varió a lo largo de dos años del 20% durante la brotación al 50% a finales de junio/principios de julio. Por el contrario, a finales de octubre/principios de noviembre, durante un periodo de lluvias muy intensas, el grado de colonización por HMA disminuyó hasta casi cero. Otro efecto observado es que la inoculación de las raíces de la vid con hongos micorrícicos *Glomus iranicum* reduce los efectos del estrés hídrico, mejora la tasa de fotosíntesis y el rendimiento de la uva, y acelera también la maduración de la uva de mesa.

Los experimentos de Martins et al. (1997) mostraron efectos positivos de la micorrización del castaño (*Castanea sativa*) sobre el crecimiento vegetativo y la actividad fotosintética de las plantas. Los hongos micorrícicos arbusculares también pueden aumentar el rendimiento de las plantas no halófilas que crecen en suelos salinos. Otro efecto de los HMA es la producción de glomalina, que agrega las partículas del suelo aumentando su agregación, lo que tiene un efecto estabilizador en el suelo y ayuda a prevenir la erosión y la lixiviación del suelo. Los HMA apoyan los procesos de formación del suelo y contribuyen a la diversidad de la cubierta vegetal, especialmente en suelos erosionados y muy contaminados.

Los hongos micorrícicos desempeñan un papel importante en la resistencia de las plantas al estrés biótico, como la tolerancia a plagas y patógenos, a través de una serie de mecanismos. La colonización de las raíces por hongos micorrícicos puede estimular los mecanismos naturales de defensa de la planta, provocando factores de resistencia sistémica inducida que pueden reducir el efecto de plagas y patógenos. Además, la mejora de la salud y el vigor de las plantas gracias al aumento de la nutrición y el agua las hace menos susceptibles a los ataques. Más aún, los HMA pueden competir con los patógenos por recursos como el espacio y los nutrientes, reduciendo así la colonización y proliferación de patógenos en la zona radicular de la planta. Por ejemplo, los hongos MA en algunas variedades de vid activan los mecanismos de defensa contra los nematodos parásitos y aumentan su tolerancia a la sequía.

Sin embargo, esta interacción simbiótica supone un coste para la planta que acoge a sus socios HMA. El carbono se transfiere de la planta al hongo, esto puede conducir a un crecimiento reducido de plantas muy jóvenes, en el establecimiento temprano y cuando hay escenarios en los que las plantas no reciben todas sus necesidades nutricionales. Por lo general, la relación coste-beneficio aumenta a medida que la planta crece o se enfrenta a situaciones de estrés o desafíos.

En algunos casos, las micorrizas también aumentan la eficacia de la absorción y acumulación de iones de metales pesados (por ejemplo, cobre, zinc, cadmio, plomo o cobalto), así como de iones cloruro y sulfato. Los hongos micorrícicos también aumentan la resistencia de las plantas a los efectos nocivos del exceso de metales pesados y contaminantes del suelo, por ejemplo, compuestos aromáticos. Sin embargo, debido a que la micorrización de las plantas contribuye a una limpieza significativa de los contaminantes orgánicos presentes en el suelo y por esta razón, dichos HMA se utilizan en la fitorremediación de zonas contaminadas.

3. Formulaciones y directrices de aplicación a diferentes sistemas de cultivo hortícola

En los últimos años ha aumentado la demanda y la producción de inóculos micorrícicos para la agricultura y la horticultura, ya que muchos agricultores ven el potencial de su uso en cultivos sostenibles. Las formulaciones se presentan en diversos formatos, como gránulos y polvos secos, líquidos, recubrimientos de

semillas y apósitos. La mayoría de las formulaciones contienen una mezcla de especies de HMA o especies individuales seleccionadas en función de su uso. La producción de productos de inóculo micorrícico puede suponer un reto, ya que sólo pueden cultivarse en presencia de plantas huésped (es decir, simbiontes obligados).

Los productos fúngicos micorrícicos están regulados en la UE por la normativa sobre abonos y bioestimulantes vegetales del Anexo II (https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32021R1768). Se clasifican como productos fertilizantes porque están destinados a mejorar la nutrición de las plantas y la fertilidad del suelo. En cambio, los productos a base de hongos micorrícicos no entran dentro de la misma normativa que los agentes de biocontrol, ya que no están clasificados como productos con propiedades fitosanitarias. Las legislaciones nacionales varían entre los países de la UE, por lo que es necesario seguir las directrices y políticas locales para registrar los productos fúngicos micorrícicos. Por consiguiente, los fabricantes de estos productos deben registrarlos en cada país de la UE en el que pretendan venderlos.

Muchos productos contienen especies de HMA que se encuentran habitualmente en muchos entornos agrícolas y hortícolas, en particular especies de *Rhizophagus* y *Funneliformis* (antes conocidas como *Glomus*). A medida que aumenta la tecnología de producción, también lo hace el número de especies de HMA incluidas en los productos y de productos adaptados a diferentes entornos. Aunque se considera que los HMA son inespecíficos en cuanto a su potencial de colonización de distintas especies, es importante clasificar el variado conjunto de especies de HMA en función de sus preferencias ambientales y de hospedante. Esto permite identificar las mejores estrategias para la formulación del inóculo y los métodos de producción y aplicación adecuados para diferentes condiciones (por ejemplo, campo abierto, invernadero, etapa de trasplante, etapa de propagación in vitro, reverdecimiento urbano, etc.). Por lo tanto, una tecnología adecuada para la producción de inóculos, así como de medios de formulación, es clave para su aplicación eficaz.

Aunque la inoculación de plantas con hongos micorrícicos es una práctica bien conocida, su uso más amplio sigue viéndose obstaculizado en algunos casos por la formulación de inóculos capaces de asegurar un efecto fiable y consistente en condiciones de campo. Sin embargo, es fundamental concienciar a la comunidad de cultivadores sobre el uso de estos productos y cómo su aplicación difiere de los enfoques químicos estándar. En particular, los productos individuales varían en sus dosis de aplicación y en las instrucciones de aplicación. Por consiguiente, deben seguirse las directrices de uso de los fabricantes.

En general, a la hora de aplicar HMA en entornos de cultivo hay que tener en cuenta una serie de factores clave:

- Aplicación - Cualquier inóculo de AMF necesita ser aplicado directamente a las raíces de las plantas, ya sea como una inmersión de la raíz, aplicado durante el trasplante en un agujero cerca de la planta joven o por debajo o junto a la semilla en la germinación. Es preferible inocular las plantas durante sus primeras etapas de desarrollo.
- Medio ambiente - El medio ambiente puede afectar a los HMA y ciertas formulaciones pueden ser más adecuadas en algunas condiciones ambientales específicas. En particular, el tipo de cultivo, las condiciones del suelo y los métodos de plantación pueden desempeñar un papel importante en el efecto de la aplicación de los HMA y su formulación. Por ejemplo, hay que saber que una aplicación elevada de productos químicos puede comprometer la eficacia de los HMA (es decir, niveles muy elevados de

nutrientes, especialmente de fósforo, determinarán un riesgo en la asociación de los HMA con las raíces). Condiciones ambientales extremas como calor excesivo, pH bajo o mucha agua pueden sugerir la elección de especies específicas de HMA que se adapten mejor a tales condiciones. Conviene cuidar el pH correcto del suelo, ya que un pH inferior a 5,5 limita la colonización de las raíces por los hongos micorrícicos arbusculares.

- Tratamiento post-plantación - El efecto de la post-plantación podría tener un efecto en el éxito de la asociación de HMA. Una aplicación muy alta de fungicidas poco después de la plantación podría reducir mucho las posibilidades de colonización. Muchos fungicidas y herbicidas son compatibles con los HMA, sin embargo, una cuidadosa selección y el momento de las aplicaciones pueden ser apropiados. Los HMA necesitan una planta huésped viva para sobrevivir; los procesos que dejan el suelo desprovisto de plantas vivas como el laboreo, el arranque de huertos, el control de malas hierbas o los periodos de barbecho, agotarían rápidamente la viabilidad de los HMA en el suelo.
- Consideraciones de coste-beneficio - El coste para el agricultor de la aplicación del inóculo debe considerarse razonable y económicamente sostenible. La evaluación de los beneficios para los cultivos de ciclo corto (por ejemplo, hierbas y ensaladas) frente a los cultivos perennes (frutales y forestales) tendría que ser analizada junto con el beneficio para los cultivos, especialmente para aquellos muy exigentes en nutrientes. Algunos sistemas de cultivo pueden ser más adecuados que otros para la aplicación de HMA.
- Interacciones con otros organismos - La interacción entre los HMA y otros microbios beneficiosos parece aumentar sus potencialidades. Por ejemplo, en muchos estudios, las comunidades adaptadas que comprenden diferentes especies de HMA y otros hongos beneficiosos como Trichoderma y bacterias beneficiosas muestran mayores beneficios y niveles más altos de colonización de HMA.

4. Gestión de los cultivos para aprovechar mejor la actividad de los HMA proponiendo prácticas de gestión que aumenten la eficacia de los HMA en el crecimiento y el rendimiento de los cultivos.

Muchos aspectos de las prácticas convencionales de gestión agrícola afectan a la diversidad y abundancia de los HMA. El uso cada vez mayor del monocultivo, que reduce la biodiversidad sobre el suelo, reduce la microbiología subterránea del suelo, incluidos los HMA. Los altos niveles de productos químicos utilizados en la agricultura, las tasas de fertilizantes (con niveles excesivos de fosfato) necesarios para mantener los rendimientos de los cultivos modernos, además de las aplicaciones de pesticidas y fungicidas, reducen las poblaciones de estos importantes microbios. Los cultivos han sido muy domesticados durante muchas décadas y la mayoría de los programas de mejora no tienen en cuenta cómo interactúan los nuevos genotipos con los microbios del suelo. Es probable que los suelos en los que se realizan cultivos con muchos insumos ofrezcan condiciones menos favorables para albergar microbios, con bajos niveles de materia orgánica y una estructura del suelo reducida. Muchos cultivos se realizan ahora en sustratos sin suelo, como la fibra de coco. Estos sustratos están desprovistos de microbios y, como tales, los preparados disponibles comercialmente pueden ser clave. Todas estas prácticas modernas están reduciendo la biología del suelo en la agricultura y la horticultura.

Si se quiere utilizar mejor los microorganismos beneficiosos y los HMA en la horticultura comercial, hay que tener en cuenta las prácticas que fomentan el desarrollo de los HMA. Si se aplican preparados comerciales a

sistemas comerciales, debemos estudiar la mejor manera de garantizar su supervivencia y longevidad en los cultivos comerciales. Muchos agricultores también están estudiando la forma de reactivar o fomentar las poblaciones autóctonas de HMA mediante la adopción de métodos e intervenciones sostenibles.

Son muchos los estudios que se han realizado para examinar los efectos de las técnicas de gestión de cultivos llevadas a cabo en diferentes condiciones edafoclimáticas. Aunque el entorno, el tipo de suelo y la ubicación añaden variabilidad a los datos recogidos en estos estudios, surgen patrones universales:

- Perturbación del suelo - El uso de la labranza y la perturbación del suelo (que incluiría el arranque en el huerto) tiene un gran efecto sobre las poblaciones de HMA en el suelo. La alteración excesiva del suelo rompe las redes hifales establecidas en el suelo, reduciendo los efectos beneficiosos de los HMA. El laboreo mecánico del suelo afecta a las comunidades de HMA y conduce a un menor recuento de esporas, una menor colonización de las raíces, una menor diversidad taxonómica de los HMA y una disminución del micelio extra-radical en comparación con el suelo no perturbado. Oehl et al [2003] descubrieron que el cultivo intensivo del suelo reducía la diversidad de hongos micorrícicos. Este trabajo se realizó en tierras de cultivo y praderas, pero los resultados también pueden aplicarse a los cultivos intensivos de frutales. Para mantener y fomentar las poblaciones de HMA en los suelos, los cultivadores deberían reducir en la medida de lo posible las perturbaciones de sus suelos.
- Aplicación de productos químicos - Aunque muchos fungicidas son compatibles con AMF, se debe tener cuidado para reducir su aplicación y buscar el asesoramiento de los productores de inóculo para garantizar que se aplica la química correcta. El momento de aplicación de los fungicidas también es importante, ya que no sería recomendable un empapado excesivo en el establecimiento temprano de los HMA. La compatibilidad del glifosato con los HMA ha sido objeto de debate en los últimos años y todavía no está del todo claro cómo afecta este producto químico a las poblaciones de HMA.
- Aplicación de fertilizantes - Los aportes muy elevados de fertilizantes anulan claramente la necesidad de que las plantas dediquen sus recursos a asociarse con los HMA. Para asegurar una producción suficiente, los agricultores necesitan aplicar fertilizantes a los cultivos, pero esto debería reducirse si se quiere fomentar los HMA en el sistema, ahorrando al agricultor dinero en costosos productos químicos y trabajando hacia la sostenibilidad. Niveles muy altos de fósforo fácilmente disponible van a tener los efectos más perjudiciales. Mantener niveles adecuados de materia orgánica en el suelo es también importante para proporcionar recursos que los HMA puedan explorar en busca de nutrición y para proporcionar una mejor estructura y drenaje del suelo.
- Diversidad de cultivos - La biodiversidad sobre el suelo es importante para fomentar la diversidad de especies de HMA. En granjas comerciales esto se puede conseguir incrementando la diversidad de plantas no cultivadas, como franjas de flores silvestres, cultivos de cobertura, interplantaciones y rotaciones. Debido a la naturaleza simbiótica obligatoria de los HMA, tener el suelo desnudo durante largos periodos sin raíces vivas reduciría enormemente las poblaciones.

La aplicación de estas estrategias de gestión en explotaciones comerciales puede garantizar la existencia de entornos propicios para los HMA. El uso de los HMA podría ser un factor clave para lograr un cultivo sostenible si se comprende que hay que tener en cuenta diferentes estrategias cuando se aplica la biología (en lugar de la química tradicional) a los sistemas comerciales. Se necesita más investigación para diseñar ensayos de campo sencillos y fiables en cultivos hortícolas comerciales para cuantificar el impacto de las

comunidades de HMA en el crecimiento de los cultivos, los rendimientos y la sostenibilidad del agroecosistema.

Los estudios muestran una diferencia entre la composición de la comunidad de HMA a nivel de género entre los sistemas de agricultura ecológica y convencional, con prácticas de agricultura ecológica que muestran aumentar la riqueza de las familias de HMA en los suelos; sin embargo, a menudo los géneros más abundantes se observan en ambos sistemas. Las prácticas agrícolas, como la agricultura ecológica, pueden tener un efecto positivo o neutro sobre las comunidades de HMA en el suelo (Manoharan et al. 2017), las prácticas de agricultura ecológica pueden aumentar la riqueza de la familia Gigasporaceae de HMA en los suelos. El principal factor, sin embargo, en el sistema de agricultura convencional que causa la disminución de la riqueza de AMF estaba relacionado con las altas concentraciones de carbono y nitrógeno del suelo (Wadhan et al. 2021). Además, los factores del suelo como el contenido de nitrógeno, fósforo y potasio, y también las relaciones carbono/fósforo y nitrógeno/fósforo dieron forma a la comunidad total de HMA.

Algunos estudios muestran que las comunidades de HMA en suelos agrícolas responden a sistemas agrícolas de larga duración y son resistentes a sequías estivales de corta duración. Se desconoce si la capacidad de las comunidades de HMA para tolerar la sequía depende de las propiedades del suelo, de la diversidad y composición de las comunidades de HMA o de las comunidades vegetales asociadas. Queda claro que, dado el aumento de las temperaturas globales y la frecuencia de fenómenos meteorológicos extremos como el calor y las precipitaciones, tenemos que entender cómo afecta esto a las poblaciones de HMA y cómo podemos utilizar mejor estos hongos para aumentar la resistencia de las plantas de los principales cultivos hortícolas para hacer frente a estos desafíos.

La falta de prácticas sólidas de inoculación y de estudios a gran escala con análisis de costes y beneficios de la aplicación de HMA sigue siendo un obstáculo importante para la introducción estable de HMA en los protocolos de cultivo.

Referencias

Al-Karaki G., McMichael B., Zak J. 2004. Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. Mycorrhiza, 14, 263-269.

Bonfante P., Genre A. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. Nature communications, 1(1), 48.

Helgason T., Fitter A. 2005. The ecology and evolution of the arbuscular mycorrhizal fungi. Mycologist, 19(3), 96–101.

Manoharan L., Rosenstock N. P., Williams A., Hedlund K. 2017. Agricultural management practices influence AMF diversity and community composition with cascading effects on plant productivity. Applied Soil Ecology, 115, 53-59.

Marschner H., Dell B. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. Plant and Soil, 159, 89–102.

Martins A., Casimiro A., Pais M.S. 1997. Influence of mycorrhization on physiological parameters of micropropagated *Castanea sativa* Mill. plants. Mycorrhiza, 7, 161-165.

Oehl F., Sieverding E., Ineichen K., Mäder P., Boller T., Wiemken A., 2003. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of central Europe. Applied Environmental Microbiology 69, 2816–2824.

Smith S. E., Read D. J. 2008. Mycorrhizal symbiosis. 3rd ed. Academic Press, San Diego.

Wadhan S.F.M., Reitz T., Heintz-Buschart A., Schädler M., Roscher R., Breitkreuz C., Schnabel B., Purahong W., Buscot F. 2021. Organic agricultural practice enhances arbuscular mycorrhizal symbiosis in correspondence to soil warming and altered precipitation patterns. Environmental Microbiology, 23(10), 6163–6176.

Capítulo 2. Productos microbianos para el biocontrol de los cultivos hortícolas

Magdalena Ptaszek[1], Małgorzata Tartanus[1], Massimo Pugliese[2]

[1]Instituto Nacional de Investigación Hortícola, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, POLONIA
[2]Universidad de Turín - Agroinnova, Largo Paolo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO), ITALIA

La protección de las plantas es uno de los principales retos de la horticultura moderna. Por ello, se están desarrollando nuevos enfoques, entre ellos el uso de microorganismos como biopesticidas sostenibles y eficaces. El objetivo de este capítulo es demostrar las posibilidades de utilizar microorganismos beneficiosos en la protección de las plantas contra patógenos y plagas, tanto foliares como transmitidos por el suelo. Además, se presenta la multifuncionalidad de los microorganismos en la producción vegetal, así como las ventajas e inconvenientes de su uso. Se presta gran atención a las condiciones que deben cumplirse en la aplicación de productos microbianos y a los factores que influyen en la consecución de su elevada eficacia, así como a los aspectos prácticos de la utilización de bioplaguicidas que contienen diversos microorganismos. Por último, también se debate la cuestión de la normativa legal para la comercialización de bioproductos.

1. Usos de microorganismos para el biocontrol

Los microorganismos y sus comunidades (microbioma) desempeñan un papel fundamental en la biodiversidad y el funcionamiento de todos los demás organismos vivos, impulsando la evolución y la adaptación ecológica desde el principio de la vida en la Tierra. La relación huésped-microbioma, independientemente del organismo -planta, animal o humano-, afecta a la capacidad del huésped para hacer frente a las tensiones abióticas y bióticas y tiene implicaciones biológicas (por ejemplo, en la fisiología o el metabolismo) y ecológicas (por ejemplo, en las interacciones planta-parásito) relevantes para las actividades económicas y sociales humanas. Por lo tanto, cada vez está más claro que una gestión adecuada del microbioma en los sistemas agrícolas puede fomentar una producción sostenible y respetuosa con el medio ambiente. Así pues, los productos basados en microorganismos o derivados de ellos pueden ser una herramienta eficaz para gestionar el microbioma del suelo y/o de las plantas.

La historia del uso de microorganismos beneficiosos en la agricultura comenzó en el siglo XIX. Desde entonces, se han realizado muchos estudios importantes sobre el aislamiento de cepas individuales de bacterias y hongos, su caracterización y su uso potencial como biopesticidas o biofertilizantes. Los biopesticidas se definen como productos fitosanitarios que contienen grupos de microorganismos como virus, bacterias y hongos, así como nematodos. La lista de "sustancias activas microbiológicas" autorizadas actualmente por la Unión Europea está disponible en: https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en. Teniendo en cuenta las normas de la Estrategia de Biodiversidad de la Unión Europea para reducir el uso de productos fitosanitarios químicos en un 50% hasta 2023, los biopesticidas desempeñarán un papel clave en las prácticas agrícolas en todo el mundo. Por esta razón, el uso de productos microbianos se está convirtiendo en una alternativa viable a los productos fitosanitarios químicos, como confirma el creciente número de productos de base microbiana que aparecen en el mercado en el contexto de la gestión integrada de enfermedades y plagas. También hay que mencionar que muchos productos que contienen inoculantes microbianos y muestran actividad de control de patógenos y plagas no están registrados como productos fitosanitarios, sino como preparados microbianos que estimulan la actividad

microbiana en los suelos o tienen un efecto beneficioso sobre el crecimiento y el rendimiento de las plantas. Esto se debe al hecho de que, en la Unión Europea, el proceso de registro, los requisitos y los costes de los plaguicidas de base microbiana son similares a los necesarios para los plaguicidas químicos (Reglamento CE 1107/2009).

Sin embargo, aún persiste el paradigma químico, en el que se utiliza un producto para eliminar de forma eficaz, fácil y rápida las plagas dañinas, y el uso de biopesticidas se considera con demasiada frecuencia un simple sustituto de los pesticidas químicos. Sin duda, este enfoque no es adecuado, ya que no tiene en cuenta los diversos factores que influyen en la eficacia del control con los llamados biopesticidas de "materia viva". Un enfoque alternativo, y quizás mejor, complementario al uso de biopesticidas, es manipular el entorno del cultivo para aumentar la población del microbioma nativo con el fin de proporcionar cierta protección contra plagas o enfermedades (biocontrol conservador). Cuando se considera el control de plagas (insectos y otros artrópodos), los hongos entomopatógenos son el grupo de biopesticidas que ha proporcionado las soluciones más útiles. Un estudio mundial reciente mostró que hay 129 productos micoinsecticidas disponibles (de Faria y Wraight 2007). Las especies más utilizadas para este fin pertenecen a los ascomicetos e incluyen *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartti*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea*. Estas especies suelen ser generalistas, es decir, parasitan una gran variedad de especies de insectos dañinos, pero algunas son especializadas (por ejemplo, *B. brongniartii* sólo parasita especies del género Melolontha) (Zimmermann 2007). Sin embargo, los virus patógenos para los insectos suscitan un interés creciente, aunque el desarrollo de resistencia de un insecto dañino a una cepa insecticida parece ser un factor importante a la hora de determinar el uso correcto de tales productos, como se ha puesto de relieve en el caso del granulovirus de la carpocapsa.

El enfoque de la fumigación de cultivos con un agente microbiano, es decir, la distribución de formulaciones de biopesticidas, es análogo al utilizado para los pesticidas sintéticos: el control de insectos se realiza únicamente mediante el organismo utilizado (Jaroński 2010). Las razones técnicas para el uso de la inundación están relacionadas con la biología de las especies entomopatógenas, pero también con el hecho de que la mayoría de los sistemas de cultivo y sus plagas asociadas son transitorios, se producen sólo durante una temporada de crecimiento, a veces sólo durante unas pocas semanas. La interrupción temporal del hábitat cultural no sólo elimina las plagas, sino que en muchos casos también elimina el agente microbiano que puede controlarlas. Por lo tanto, son necesarias aplicaciones repetidas, adaptando así a los biopesticidas un paradigma químico familiar para el agricultor, que simplemente aplica los hongos beneficiosos como hace con los pesticidas químicos. En el caso de los biofungicidas, que se utilizan para controlar enfermedades de las plantas, existen formulaciones que pueden aplicarse tanto antes como después de la cosecha. Sin embargo, incluso en este caso, la variedad de especies y cepas conocidas por su actividad de biocontrol no se corresponde con el número de microorganismos registrados como sustancias activas. Además, la mayoría de las cepas autorizadas (por ejemplo, *Trichoderma* sp.) están relacionadas con el control de patógenos transmitidos por el suelo (Ptaszek et al. 2023). Recientemente, sin embargo, ha crecido el interés por los biofungicidas que ofrecen la posibilidad de controlar las infecciones que se producen en el campo, pero también durante el almacenamiento (por ejemplo, las causadas por *Botrytis cinerea*, *Penicillium* sp., *Alternaria* sp. etc.) (Sellitto et al. 2021). El uso de biofungicidas antes de la cosecha evita los riesgos derivados de la presencia de residuos de plaguicidas que no cumplen los límites establecidos por la legislación de la UE. En este sentido, cabe destacar que en la última actualización del Reglamento (CE) 1107/2009 relativo a las

sustancias activas de los plaguicidas que no requieren el establecimiento de límites máximos de residuos, 21 de las 39 sustancias activas enumeradas son de origen microbiano. No obstante, además de los factores que influyen en la eficacia de los bioinoculantes utilizados durante el cultivo, es importante tener en cuenta que la fase posterior a la cosecha se caracteriza por las intervenciones fisicoquímicas (por ejemplo, el lavado o la modificación de la atmósfera de almacenamiento) utilizadas para preservar o prolongar la vida útil de los productos, que representan, por tanto, otro factor de variabilidad.

Además, el uso de productos de base microbiana reduce el riesgo de resistencia de los patógenos, que suele producirse con la aplicación de plaguicidas. La acción de los microorganismos en la protección de las plantas puede basarse en diferentes mecanismos, tanto directos como indirectos. Los efectos directos sobre el patógeno se basan en el antagonismo microbiano a través de la antibiosis, la competencia por los nutrientes o los nichos de colonización y el parasitismo. Los microorganismos también pueden alterar las condiciones de crecimiento necesarias para el desarrollo de los patógenos. El mecanismo indirecto implica la inducción de resistencia en la planta, lo que puede dar lugar a una reducción de la proliferación, la agresividad o el daño del patógeno.

Los microorganismos utilizados en la protección biológica de las plantas deben cumplir determinados requisitos para contribuir eficazmente a protegerlas contra plagas o agentes patógenos:

- deben ser seguros para la salud humana,
- deben ser genéticamente estables y tener una gran viabilidad y resistencia a las fluctuaciones medioambientales,
- deben tener unas necesidades nutricionales moderadas y un ritmo de crecimiento rápido,
- deben ser específicos para la plaga o el patógeno en cuestión, a fin de evitar efectos adversos en los organismos beneficiosos y evitar efectos secundarios indeseables,
- deben ser compatibles con distintos sistemas de cultivo, incluido el uso de fertilizantes y otros productos fitosanitarios,
- deben ser eficaces en el control de plagas o patógenos. Su capacidad para colonizar y competir con patógenos es un factor clave.

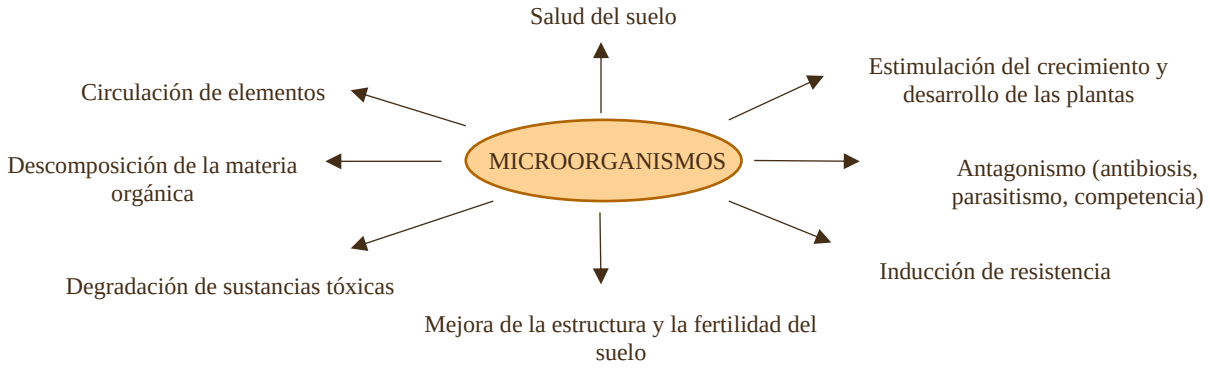

Fig. 2.1. Funciones más importantes de los microorganismos

2. Biocontrol de plagas y patógenos del suelo: factores a tener en cuenta para lograr una alta eficacia

Cabe señalar que actualmente la mayoría de los productos fitosanitarios biológicos basados en microorganismos contienen cepas individuales, y sólo uno está registrado como consorcio (*Trichoderma asperellum* cepa ICC 012+ *Trichoderma gamsi* ICC 080). Aunque la eficacia de las cepas bacterianas o fúngicas seleccionadas en pruebas de laboratorio o invernadero es satisfactoria, en condiciones de campo la eficacia de los bioproductos sigue siendo uno de los principales retos de la agricultura moderna (Kowalska et al. 2020; Michev et al. 2021). Los factores que limitan el logro de una alta eficacia de tales formulaciones basadas en microorganismos pueden deberse a factores bióticos y abióticos, como la competencia de microorganismos nativos o la susceptibilidad a condiciones ambientales variables, pero también las condiciones climáticas y meteorológicas, los métodos de aplicación y las prácticas de gestión de cultivos (Trivedi et al. 2020; Malusà et al. 2021). A efectos prácticos, los factores mencionados pueden dividirse en cuatro categorías: dependientes del cultivo (Planta), propiedades del suelo (Suelo), proceso de formulación (Producto) y prácticas agrícolas (Agricultor) (Figura 2.2.).

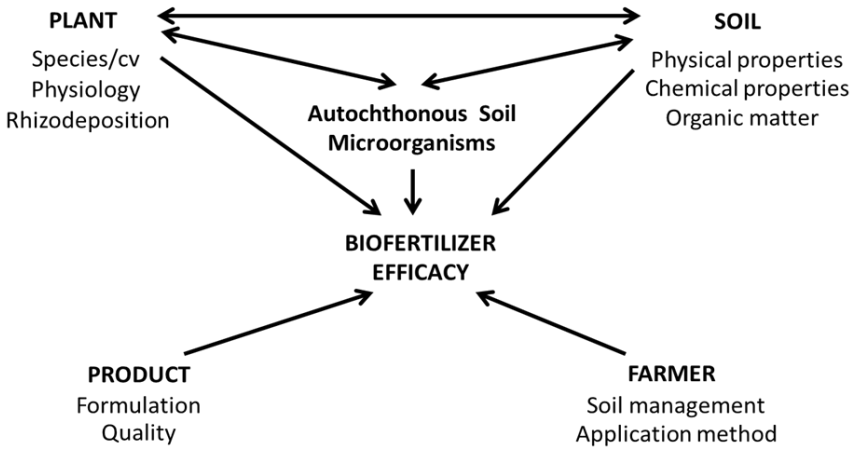

Fig. 2.2. Factores que influyen en la eficacia de los bioproductos

El estado fisiológico de la planta es importante en las interacciones con los biopesticidas. Los componentes de las hojas pueden afectar a la persistencia de las esporas y a la susceptibilidad de los insectos a la infección por bioinsecticidas. El nivel nutricional de la planta también influye en la salud general de las plagas de insectos y, por tanto, puede mediar en el efecto de los entomopatógenos fúngicos. Además, se ha observado que la presencia de fitopatógenos puede afectar a la susceptibilidad de la plaga a los hongos insecticidas: por ejemplo, se ha descubierto que *M. anisopliae* causa el 100% de mortalidad de la plaga cuando ésta se encuentra sobre hojas infectadas por el hongo, pero sólo el 50% de mortalidad cuando la plaga se alimenta de hojas no infectadas (Rostas y Hilker 2003).

La dificultad para garantizar una eficacia constante contra los patógenos y plagas de las plantas aumenta las complicaciones y dificultades en el uso de biopesticidas a pesar de su seguridad. En la práctica, el nivel de eficacia alcanzable es definitivamente un "juego de números": deben aplicarse suficientes esporas para reducir la población de insectos dañinos o prevenir la infección por patógenos. En el caso de los bioinsecticidas, el modo de acción por el que la cepa parasita (mediante infección cutánea o a través del sistema digestivo), el comportamiento del insecto (en la planta o en el suelo) y la morfología de la planta

determinan el mejor método de aplicación para garantizar un control eficaz. Del mismo modo, en el caso de los biofungicidas, el ciclo biológico del patógeno y el lugar de infección determinan el momento y el método de aplicación para permitir la colonización preventiva con un agente de biocontrol contra el patógeno.

Las propiedades químicas (pH, materia orgánica y contenido en nutrientes) y físicas (textura) del suelo influyen en las comunidades bacterianas y fúngicas y, por tanto, en el potencial de colonización y la eficacia de los bioplaguicidas aplicados al suelo. La competencia del microbioma nativo, que también se ve influida por las propiedades del suelo, aumenta la variabilidad de la adaptabilidad y persistencia de los bioinoculantes. Sin embargo, las condiciones óptimas para el crecimiento microbiano (humedad, temperatura, contenido de materia orgánica, etc.) favorecen en general la persistencia y la colonización de las raíces por los bioinóculos.

El proceso de producción del inóculo es crucial para conseguir una formulación de alta calidad, ya que existe una correlación directa entre la abundancia de microorganismos y la calidad del producto final. Dado que el agente activo de las formulaciones microbianas son bacterias u hongos viables, un problema clave es desarrollar una formulación con una larga vida útil. Se utilizan aditivos para mejorar los parámetros físicos y químicos de los inóculos (adhesivos, emulsionantes, compuestos amortiguadores) y prolongar la vida de los microorganismos. La formulación óptima protege las células microbianas durante el almacenamiento y el transporte, aumentando potencialmente la vida útil del inóculo en el suelo o en la planta, al tiempo que resulta inerte para el medio ambiente. Existen dos formas básicas de preparados microbianos: secos o granulados y líquidos. En general, las formulaciones granulares muestran una mayor eficacia en condiciones de suelo, mientras que las formulaciones líquidas, aunque son más fáciles de aplicar, tienen una vida útil más corta. Otro factor importante que afecta a la eficacia de los productos microbianos son las condiciones en que se almacenan. Almacenar los productos a temperaturas extremas o permitir que una formulación seca se humedezca provoca una disminución más rápida del número de microbios. Los agricultores que utilicen preparados que contengan bacterias u hongos deben ser conscientes de los factores que afectan a la vida útil de la formulación.

El establecimiento de normas jurídicas mínimas para el registro y la comercialización de productos microbianos es importante para garantizar un nivel mínimo de calidad, que es otro factor que influye en la eficacia de los bioproductos en el campo. En el caso de los bioplaguicidas, su calidad está garantizada por un largo y costoso proceso de registro y supervisión de la calidad de los productos en el mercado, que debe cumplir cada Estado miembro de la UE.

Comprender los factores que influyen en la actividad microbiana beneficiosa es esencial para que los agricultores puedan incorporar con éxito tales productos a la práctica. La estructura del microbioma del suelo y, en consecuencia, la sostenibilidad o la eficacia de los bioproductos inoculados, se ven influidas fundamentalmente por las prácticas de gestión agrícola, con efectos contrastados cuando se comparan sistemas intensivos y otros más respetuosos con el medio ambiente: prácticas como el laboreo, la protección de los cultivos, la fertilización mineral y orgánica o el régimen hídrico pueden alterar la eficacia de los biopesticidas aplicados al suelo.

En el caso de los bioplaguicidas, la práctica que más puede afectar a su eficacia es sin duda la resistencia a los productos sintéticos (Karpouzas et al. 2022). El lugar de interacción química entre los bioinsecticidas y los residuos de productos sintéticos es la superficie de la hoja, donde la espora del hongo beneficioso permanece

latente en la mayoría de las condiciones hasta que entra en contacto con la epidermis del insecto. Algunos productos agroquímicos son absorbidos rápidamente por la hoja tras su aplicación: por ejemplo, los fungicidas estrobilurínicos son tóxicos *in vitro* para los entomopatógenos fúngicos y para una amplia gama de hongos, pero son absorbidos por la hoja a los 15 minutos de su aplicación, por lo que el contacto entre esporas fúngicas ya presentes o aplicadas al mismo tiempo es muy breve y, por tanto, no resulta especialmente problemático para el bioinsecticida. Obviamente, los bioplaguicidas aplicados después de fungicidas sintéticos no deben entrar en contacto con sus residuos, por lo que antes de aplicar un bioplaguicida debe tenerse en cuenta el periodo de retirada de los productos aplicados previamente.

Otra limitación para el uso de biopesticidas a escala comercial es su correcta aplicación y dosificación. El efecto de la dosis es especialmente importante en el caso de los biopesticidas. En general, cuando se aplican hongos insecticidas a cultivos de campo o invernadero, deben aplicarse al menos 10^{-10} propágulos ha^{-1} para garantizar un buen nivel de eficacia (Jaroński 2010). Esto equivale a 10^5 propágulos cm^{-2} en una superficie plana o, teóricamente, a 10^4 propágulos cm^{-2} en un cultivo con un índice de área foliar normal. También se necesitan dosis similares para los biofungicidas. La situación se complica en el caso de los tratamientos de control de plagas en el suelo, en los que, además de la dosis adecuada, es necesario facilitar el contacto entre el biopesticida y la plaga o el patógeno. Por lo tanto, la técnica de aplicación desempeña un papel clave para garantizar la acción defensiva. Concentrando los propágulos del bioplaguicida en una zona pequeña y bien delimitada, se puede conseguir un aumento de su concentración de 6 a 30 veces. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, tras la aplicación en las hojas, la concentración de propágulos disminuye en función de diversos factores, como la luz solar, la lluvia, la temperatura, la humedad, la composición química de la superficie foliar y la microbiota asociada a la planta. En el suelo se da una situación similar: en muchos casos, especialmente en el caso de los preparados bacterianos, la persistencia de los bioinoculantes en el suelo o en la rizosfera de las raíces se limita generalmente a 30-40 días después de la inoculación (Bashan et al. 1995). Por lo tanto, es necesario asegurar múltiples aplicaciones (2-4) por temporada de cultivo, con una frecuencia que depende de las condiciones climáticas y del desarrollo de la plaga/patógeno en el caso de los bioplaguicidas. Esto no se considera una desventaja en el caso de los preparados microbianos, ya que también se realizan varios tratamientos por temporada de cultivo en el caso de los preparados sintéticos.

El método de aplicación también puede afectar al rendimiento de los biopesticidas. Para su distribución, especialmente en formulaciones granulares, suele disponerse ya de máquinas. La aplicación de bioinoculantes mediante aderezo de semillas o al suelo en forma líquida proporciona una eficacia comparable en la producción de diferentes especies vegetales (Deaker et al., 2004). La aplicación de formulaciones líquidas mediante pulverizador hidráulico solo afecta ligeramente a la viabilidad de las bacterias utilizadas para la protección de los cultivos, pero el tiempo de trabajo prolongado reduce el número de células viables que llegan a la superficie de las hojas hasta en un 50% (Świechowski et al. 2012). El volumen de agua utilizado para la aplicación y la presencia de adyuvantes también pueden afectar a la eficacia de los biopesticidas fúngicos. Debe prestarse especial atención al momento de distribución del bioproducto: la sobreexposición a la luz (especialmente a la luz ultravioleta) o las condiciones de baja humedad pueden reducir la viabilidad y longevidad de los microorganismos y, en consecuencia, su eficacia.

También es importante garantizar que los microorganismos introducidos en el medio tengan las condiciones adecuadas para su proliferación. También será importante el aspecto del almacenamiento adecuado de los bioplaguicidas, que depende de su composición.

Por estas razones, en el marco del proyecto Excalibur (Horizonte 2020), se realizan ensayos experimentales de campo para investigar los nuevos inoculantes microbianos multifuncionales del suelo en tres cultivos modelo de diferentes regiones pedoclimáticas.

Biocontrol de patógenos transmitidos por el suelo: ejemplos prácticos

El biocontrol de patógenos transmitidos por el suelo implica el uso de microorganismos beneficiosos para suprimir el crecimiento de organismos patógenos en el suelo. Estos microorganismos emplean varios mecanismos para lograr el biocontrol, como la antibiosis, el hiperparasitismo, la inducción de resistencia y la competencia por el espacio y los nutrientes. Por ejemplo, algunas cepas bacterianas, como las pseudomonas fluorescentes, producen metabolitos secundarios extracelulares que inhiben el crecimiento de patógenos del suelo. Además, algunos agentes de control biológico provocan una resistencia sistémica inducida en las plantas huésped, mientras que otros interfieren específicamente en los factores de patogenicidad de los hongos. La eficacia de los productos de origen microbiano para controlar los patógenos del suelo depende de varios factores, como la diversidad y abundancia de taxones patógenos, el microbioma del suelo y las condiciones ambientales. Comprender las interacciones entre el suelo, las plantas, los patógenos y los agentes de biocontrol es crucial para la aplicación práctica de estrategias de biocontrol. Por lo tanto, la investigación en curso tiene como objetivo mejorar la eficacia de los productos basados en microbios y evaluar sus impactos en el microbioma del suelo (Haas y Défago 2005; Ptaszek et al. 2023; Handelsman y Stabb 1996).

Algunos ejemplos de microorganismos utilizados para el biocontrol de patógenos transmitidos por el suelo son:

- *Pseudomonas* spp. - Los miembros del género *Pseudomonas*, como las pseudomonas fluorescentes, son conocidos por su capacidad para producir antibióticos antifúngicos, provocar resistencia sistémica inducida en las plantas huésped e interferir con los factores de patogenicidad fúngica (Haas y Défago 2005).
- *Bacillus* spp. - Ciertas cepas de bacterias *Bacillus*, como *Bacillus amyloliquefaciens*, se han utilizado como agentes de biocontrol para suprimir patógenos transmitidos por el suelo. Pueden producir diversos compuestos antifúngicos e inducir resistencia sistémica en las plantas (Bonaterra et al. 2002).
- *Streptomyces* spp. - Algunas especies de bacterias *Streptomyces* se han estudiado por su potencial en el control biológico. Son conocidas por producir una amplia gama de compuestos bioactivos, incluidos antibióticos y agentes antifúngicos (Bonaterra et al. 2002).
- *Trichoderma* spp. - *Trichoderma* es un conocido hongo de biocontrol utilizado para suprimir patógenos transmitidos por el suelo. Actúa a través de varios mecanismos como el micoparasitismo, la antibiosis y la competencia, y ha sido ampliamente estudiado por su potencial en el control de una serie de hongos patógenos transmitidos por el suelo, incluyendo *Fusarium*, *Pythium* y *Rhizoctonia* (Graham y Strauss 2021).
- *Fusarium* sp. - El uso de cepas antagonistas de *Fusarium* para controlar patógenos transmitidos por el suelo se ha estudiado en el contexto del control biológico. Por ejemplo, la cepa K5 de *Fusarium* ha demostrado un control de la enfermedad del 69% y un aumento de la producción de biomasa de albahaca en comparación con el control inoculado (Pugliese et al. 2008), y se sabe que la cepa MSA35 de Fusarium produce compuestos volátiles para controlar la marchitez por Fusarium (Gilardi et al. 2005).

Estos microorganismos emplean diversos mecanismos, como la antibiosis, la resistencia sistémica inducida y la interferencia con factores de patogenicidad, para controlar el crecimiento de patógenos transmitidos por el suelo.

Se utilizan varios métodos para aplicar microorganismos antagonistas para controlar los patógenos transmitidos por el suelo, entre ellos:

- Tratamiento de semillas: se pueden aplicar microorganismos antagonistas a las semillas antes de plantarlas. Este método garantiza que los microorganismos estén presentes en la rizosfera, donde pueden establecerse y proporcionar protección a las plántulas emergentes.
- Aplicación al suelo: los microorganismos pueden aplicarse directamente al suelo, ya sea en forma de empapado o a través de sistemas de riego. Esto permite que los microorganismos colonicen la rizosfera y proporcionen una protección a largo plazo contra los patógenos transmitidos por el suelo.
- Incorporación a los medios de cultivo: para la producción de cultivos en invernadero o en contenedores, los microorganismos antagonistas pueden incorporarse a los medios de cultivo para proporcionar protección contra los patógenos transmitidos por el suelo (Panth et al. 2020; Pandit et al. 2022).

Estos métodos pretenden garantizar el establecimiento y la actividad de microorganismos antagonistas en la rizosfera, donde pueden controlar eficazmente los patógenos transmitidos por el suelo y contribuir a la salud de las plantas.

3. Biocontrol de plagas y patógenos que afectan a los órganos vegetales aéreos: aspectos prácticos

En la actualidad, los biopreparados a base de microorganismos como virus, bacterias y hongos se utilizan en la protección de las plantas contra enfermedades y plagas.

Virus

Constituyen un enorme grupo de patógenos de insectos, el más numeroso de los cuales es la familia *Baculoviridae*. Los representantes de este grupo son virus muy selectivos para sus huéspedes, los insectos. Las mariposas (orugas de la mosca del manzano, enrolladores de hojas, etc.) son las más atacadas, los himenópteros y los escarabajos con mucha menos frecuencia. Su virulencia suele limitarse a una familia, un género o incluso una especie de insecto en particular. Además, no se multiplican en las células de vertebrados y plantas, por lo que representan un agente de control biológico de plagas inocuo para el medio ambiente. Los efectos de su presencia en los insectos se observaron ya en el siglo XIX, pero su uso práctico sólo fue posible gracias a un conocimiento más profundo de la biología de los hospedadores, así como del mecanismo de infección y del ciclo de desarrollo de los propios virus. Los baculovirus son virus de gran tamaño que contienen ácido desoxirribonucleico (ADN) empaquetado en cápsides proteináceas en forma de bastón, que se forman principalmente en los núcleos de las células huésped. Las cápsides están fusionadas en una matriz, moléculas proteináceas llamadas cuerpos de inclusión. Esta matriz proteica, denominada polihedrina en los virus de la poliedrosis nuclear (VNP) y granulina en los virus de la granulosis (VG), los protege de los factores ambientales adversos y les permite sobrevivir fuera del organismo huésped. Su exclusividad para infectar artrópodos y su presencia en cuerpos de inclusión protectores los convierten en valiosos agentes biológicos de gran importancia práctica. Los cuerpos de inclusión transportados por el viento y la lluvia y por algunos vertebrados e invertebrados parásitos que actúan como transportadores (vectores) pueden persistir en la

naturaleza durante muchos años y constituir una fuente de infección para insectos susceptibles. Ingeridos por el insecto con su alimento, se disuelven en su intestino e, infectando la mayoría de los tejidos del huésped, provocan su muerte. Los *baculovirus* están presentes en casi todas las poblaciones naturales de insectos de Polonia. Sin embargo, su introducción adicional en forma de biopreparados aumenta su frecuencia de infección o, con la introducción de preparados virales altamente concentrados, permite reducir rápidamente la población de la plaga. No obstante, hay que recordar que la temperatura desempeña un papel importante en la acción eficaz de los preparados víricos. Tiene una influencia importante en el curso de la infección vírica. Las temperaturas inferiores a 20º C ralentizan el ritmo de multiplicación del virus, mientras que las temperaturas superiores (25-30º C) aceleran el proceso de la enfermedad vírica. La sensibilidad de los distintos estadios de la plaga a la infección vírica también varía: los estadios más jóvenes son más susceptibles.

Bacterias

Entre el amplio grupo de bacterias insecticidas de la naturaleza, la más importante para la protección de las plantas contra las plagas es la especie *Bacillus thuringiensis*, que produce un cristal proteínico que contiene la llamada delta-endotoxina responsable de la muerte del insecto. Las esporas (endosporas) son la forma de supervivencia de esta bacteria, lo que le permite sobrevivir incluso en condiciones ambientales adversas. Los cristales de endotoxina y las esporas de las distintas subespecies y aislados de *B. thuringiensis* suelen ser los ingredientes básicos de los biopreparados a base de bacterias. Se utilizan contra varias especies de plagas importantes: para las orugas de mariposa se utiliza un aislado de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, para las larvas de mosca *B. thuringiensis* var. *israelensis* y para las larvas de escarabajo *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*. El cristal en cuestión es un compuesto proteínico que necesita ser activado antes de que pueda surtir efecto. En condiciones normales, esta proteína presenta una solubilidad muy baja, lo que la hace totalmente inocua para el ser humano, los animales superiores y la mayoría de los insectos. Sin embargo, se disuelve fácilmente en un medio alcalino (pH>9,5), como el que se encuentra en el intestino medio de, por ejemplo, las orugas de mariposa. Por lo tanto, *B. thuringiensis* es un agente de control de insectos muy específico. La delta-endotoxina daña el epitelio intestinal del insecto y le impide absorber el alimento. El insecto deja de alimentarse y en su cuerpo se desarrollan sucesivas generaciones de bacterias que le provocan la muerte en los días siguientes. La inhibición de la alimentación y el retraso de la muerte del insecto es un rasgo característico de la infección por esta bacteria.

Se ha estudiado el uso de bacterias para controlar enfermedades foliares, y algunas bacterias beneficiosas han mostrado potencial para este fin. Por ejemplo, en un estudio sobre el biocontrol de enfermedades radiculares y foliares en tomate, se descubrió que los consorcios microbianos, incluidos *Pseudomonas chlororaphis* y *Pseudomonas azotoformans*, demostraban efectos antagonistas contra el patógeno foliar *Botrytis cinerea* cuando se aplicaban como pulverización foliar. Estos tratamientos redujeron la superficie de las lesiones necróticas causadas por *B. cinerea*, y los consorcios microbianos lograron una reducción de hasta el 70% de la superficie de las lesiones (Minchev et al. 2021).

Además, las bacterias del género *Bacillus* (por ejemplo, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*) también se utilizan habitualmente en la protección de las plantas contra las enfermedades. Estas bacterias presentan actividad antifúngica al producir diversos compuestos (antibióticos, enzimas, sustancias químicas) que inhiben el crecimiento de patógenos, compiten con ellos por el alimento y el espacio vital e inducen resistencia en las

plantas. El uso de bacterias *Bacillus* en la protección de las plantas suele formar parte de las estrategias de cultivo sostenible, ya que estas bacterias son seguras para el medio ambiente y no tienen efectos negativos sobre otros organismos.

Además, la investigación ha demostrado el potencial de los agentes bacterianos de biocontrol, como las cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas*, para reducir la incidencia y la gravedad de enfermedades bacterianas comunes cuando se aplican como pulverizaciones foliares (Minchev et al. 2021).

Levaduras

Las levaduras más utilizadas para el biocontrol de enfermedades de las plantas en la UE son *Candida oleophila, Aureobasidium pullulans, Metschnikowia fructicola, Cryptococcus albidus* y *Saccharomyces cerevisiae* (Freimoser et al. 2019). Estas especies de levaduras han sido reconocidas por su potencial como agentes de biocontrol contra diversos patógenos de plantas, destacando su importancia en las prácticas de agricultura sostenible. *Candida oleophila*, por ejemplo, es conocida por su fuerte actividad antagonista contra el moho y las enfermedades postcosecha de frutas de pepita. *Aureobasidium pullulans* se ha utilizado para el biocontrol de varios patógenos vegetales, incluidos hongos y bacterias, y se ha registrado para su uso en la UE como producto de biocontrol dirigido contra *B. cinerea* en uva, tomate y fresa. *Metschnikowia fructicola* ha demostrado su eficacia en el control de enfermedades postcosecha de frutas como la manzana y la pera. *Cryptococcus albidus* ha demostrado tener actividad antagonista contra varios patógenos vegetales. *Saccharomyces cerevisiae*, comúnmente conocida como levadura de panadería, se ha utilizado para el biocontrol de varios patógenos de plantas, incluidos hongos y bacterias, y también se aplican como elicitores diferentes productos formulados que contienen células de levadura secas. Estas especies de levadura han sido registradas para su uso en la UE como productos de biocontrol debido a su actividad antagonista contra diversos patógenos vegetales, sus requisitos de cultivo poco exigentes y sus limitadas preocupaciones en materia de bioseguridad. El uso de estas especies de levaduras como agentes de biocontrol tiene el potencial de reducir el uso de pesticidas químicos, que pueden tener efectos negativos sobre la salud humana y el medio ambiente (Kowalska et al. 2022). Por lo tanto, el uso de levaduras de biocontrol representa un enfoque prometedor para el desarrollo de prácticas agrícolas sostenibles (Kowalska et al. 2022).

Hongos

Además de los hongos, que pueden ser los agentes causales de peligrosas enfermedades de las plantas, existe también un amplio grupo de estos organismos que muestran capacidades específicas para actuar como antagonistas y parasitar sobre o en insectos y nematodos dañinos. Las infecciones fúngicas se reconocen fácilmente por el aspecto característico del insecto enfermo o muerto, ya que muchas especies producen micelio y esporas en el exterior del cuerpo del huésped tras su muerte, cubriéndolo con una gruesa capa a menudo de un color característico, por ejemplo, verdoso en el caso de *Metarhizum anisopliae* o blanco para *Beauveria bassiana*. El ciclo de desarrollo de la mayoría de los hongos insecticidas es similar: la fase infectiva suele ser la espora, que, tras alcanzar la cutícula del insecto, germina y entra en el insecto a través del tubo germinativo. Tras entrar en el cuerpo del hospedador, el hongo se multiplica en la hemolinfa provocando la parálisis del insecto, que muere al cabo de un tiempo. Tras la muerte del insecto, se desarrolla en su superficie un abundante micelio que da lugar a nuevas esporas que pueden ser transportadas por el viento, el agua y por insectos y otros animales.

De las casi 100.000 especies de hongos que se conocen en la actualidad, unas 800 son hongos insecticidas, de las cuales unas 12-15 especies se utilizan en la protección biológica contra insectos dañinos para las plantas, principalmente en cultivos de invernadero, pero también en el campo. Los hongos insecticidas son muy comunes en el medio ambiente y desempeñan un papel crucial al reducir las poblaciones de insectos. Las especies más comunes son *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces farinosus*, *Paecilomyces fumosorosea* y *Verticillium lecanii*, que se utilizan en mayor o menor medida en los preparados biológicos. Los hongos insecticidas son muy sensibles a la temperatura y a la humedad. Actúan por contacto y deben estar en la superficie del cuerpo del insecto para germinar y penetrar en él para causarle la muerte. Debido a los requisitos de un microclima adecuado, en la práctica los biopreparados fúngicos se utilizan principalmente en invernaderos, aunque también hay muchos informes sobre su buena eficacia en condiciones de campo, por ejemplo *B. brongniartii* para reducir las poblaciones de larvas del escarabajo de mayo. En cultivos de cobertura, se utilizan para reducir las poblaciones de, por ejemplo, mosca blanca, y en cultivos de campo también el escarabajo de la patata, la chicharrita de la col y la monilia o podredumbre parda. Se ha descubierto que anualmente alrededor del 30% de las poblaciones de pulgones de los cereales están infectadas por hongos insecticidas. También se han observado epizootias causadas por este grupo de hongos en poblaciones de dactilo, barrenador del manzano, tanaceto, escarabajo de la miel del manzano, blanqueador de la colza y otros.

En la protección biológica de las plantas contra los patógenos, las más utilizadas son las cepas de *Trichoderma*. Por ejemplo, las investigaciones llevadas a cabo por diversos centros científicos de todo el mundo han demostrado que las cepas de *Trichoderma* o sus metabolitos secundarios presentan una fuerte actividad antagonista contra diversos hongos patógenos de las plantas, compiten con los organismos patógenos y suprimen su crecimiento mediante mecanismos como la producción de antibióticos y enzimas que degradan las paredes celulares de otros hongos, potencian el crecimiento de las plantas y promueven el desarrollo del sistema radicular. *Trichoderma* también puede inducir resistencia sistémica en las plantas activando sus mecanismos de defensa. Esto incluye la activación de vías de señalización que conducen a la producción de compuestos relacionados con la defensa, haciendo que las plantas sean más resistentes a las infecciones por microorganismos patógenos. Este género también es conocido por su capacidad para producir una variedad de enzimas como quitinasas, glucanasas y proteasas, que desempeñan un papel crucial en la ruptura de las paredes celulares de los hongos patógenos, contribuyendo al control de las enfermedades (Waghunde et al. 2016; Zin y Badaluddin 2020).

Ampelomyces quisqualis es otro ejemplo de hongo de biocontrol que ha demostrado su eficacia contra patógenos foliares como el oídio y la roya. Actúa como hiperparásito, infectando y parasitando a otros hongos, con lo que suprime una amplia gama de enfermedades de las plantas, incluidas las que afectan al follaje. *Clonostachys rosea* también ha sido investigada por su potencial de biocontrol contra diversos patógenos foliares. Emplea múltiples mecanismos, como el micoparasitismo, la antibiosis y la resistencia inducida, para suprimir enfermedades foliares en diferentes cultivos (Elad 2003).

Los retos asociados al uso de hongos para el biocontrol de enfermedades foliares incluyen:

- Variabilidad e inconsistencia - El uso a gran escala de los hongos de biocontrol está limitado debido a la variabilidad e inconsistencia de su actividad de biocontrol, que puede verse influida por factores medioambientales. Esta variabilidad dificulta su aplicación generalizada.

- Sensibilidad a las influencias ambientales - Algunos hongos de control biológico son sensibles a las influencias ambientales, lo que puede afectar a su eficacia. Esta sensibilidad puede plantear problemas a la hora de mantener una supresión constante de la enfermedad en condiciones ambientales variables.
- Integración con fungicidas químicos - Integrar el biocontrol con fungicidas químicos según el calendario o los requisitos ecológicos puede ser todo un reto. Aunque esta integración puede mejorar la supresión de la enfermedad, requiere una gestión cuidadosa para garantizar la compatibilidad y eficacia de ambos métodos de control.

Fig. 2.3. Foto de Otiorhynchus sulcatus *adulto infectado por* Beauveria bassiana
Autora: Małgorzata Tartanus.

Fig. 2.4. Foto de larvas de Melolontha melolontha *infectadas por* Beauveria bassiana
Autora: Małgorzata Tartanus

4. Capacidad multifuncional de los microorganismos: una oportunidad para la gestión integrada de plagas

En el pasado, el control biológico basado en microorganismos ha consistido generalmente en el uso de una sola cepa de bacterias u hongos, también como resultado de enfoques normativos que han considerado los productos de base microbiana similares a los compuestos químicos. La eficacia de los inoculantes microbianos, especialmente los que se aplican como cepas únicas al medio ambiente, varía mucho. Por ello, actualmente la principal tendencia en protección fitosanitaria es el uso de inoculantes formados por varios microorganismos con distinto modo de acción para aumentar la eficacia de los productos microbianos y ampliar el espectro de su actividad frente a diversas especies patógenas. Los consorcios podrían diseñarse como una mezcla de diferentes cepas pertenecientes a la misma especie o compuestos por especies de diferentes géneros (Sarma et al. 2015; Minchev et al. 2021; Ptaszek et al. 2023). Los complejos formados por varios microorganismos beneficiosos podrían potenciar los efectos de biocontrol, ya que las diferentes bacterias y hongos tienen mecanismos de acción distintos. Además, los diferentes microorganismos ocupan nichos distintos en la zona radicular y, por tanto, reducen la competencia entre ellos (Sarma et al. 2015; Minchev et al. 2021). Los consorcios son superiores a la formulación de una sola cepa a nivel de tareas múltiples. Pueden inducir diferentes mecanismos de acción de los diversos microorganismos presentes, que a veces también pueden incluir mecanismos de protección de las plantas (por ejemplo, antagonismo frente a patógenos o inducción de procesos metabólicos que aumentan la tolerancia a los patógenos o hacen que la planta sea menos "apetecible" para las plagas), por lo que pueden considerarse productos "multifuncionales" (Kowalska et al. 2020; Minchev et al. 2021). Varios bioplaguicidas, incluidos algunos hongos insecticidas (por ejemplo, *Beauveria* spp.) y bacterias (por ejemplo, *Bacillus thuringiensis*), utilizados actualmente en la protección de cultivos, han demostrado efectos estimulantes sobre el crecimiento de las plantas (Kowalska et al. 2020). El doble efecto de proteger las plantas y promover la absorción de nutrientes se ha observado en algunos estudios con cepas de biopesticidas a base de *Trichoderma*. Entre las bacterias utilizadas para la protección contra patógenos, las bacterias del género *Bacillus* tienen, en general, una aplicación comercial como biopesticidas, pero también son activas en la promoción del crecimiento de las plantas.

La capacidad multifuncional de los microorganismos ofrece una vía prometedora para desarrollar alternativas inocuas y sostenibles en el marco de la Gestión Integrada de Plagas (GIP). La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) considera que la GIP es la mejor combinación de estrategias de control de patógenos y plagas, teniendo en cuenta el rendimiento, los beneficios y el perfil de seguridad. Numerosos ensayos de campo y aplicaciones prácticas aportan pruebas del éxito de la integración de los microorganismos en los programas de GIP. Estos estudios demuestran la viabilidad y eficacia del uso de microorganismos en diversos entornos agrícolas. Los microorganismos son un elemento clave para mantener el equilibrio biológico en el agroecosistema. Al explotar los diversos mecanismos de acción de los microorganismos, se pueden desarrollar estrategias sostenibles para el control de plagas y enfermedades, promoviendo la salud medioambiental y garantizando la sostenibilidad de la agricultura a largo plazo. La multifuncionalidad de los microorganismos se extiende al ciclo de los nutrientes y a la salud del suelo. Sin embargo, la producción y comercialización de consorcios microbianos presenta algunos problemas técnicos para los productores y, sobre todo, cuestiones normativas.

Los microorganismos beneficiosos de la rizosfera desempeñan un papel importante en el alivio del estrés biótico en las plantas, lo que hace atractivo su uso como bioinoculantes para reducir el uso de agentes sintéticos de control de plagas en la agricultura. Los mecanismos de reducción de patógenos por microorganismos en la rizosfera son diversos (Ptaszek et al. 2023). Algunos se basan en la interferencia directa de los microorganismos beneficiosos con la proliferación de patógenos en la rizosfera a través de diversos mecanismos de competencia, por ejemplo, por los nutrientes o el espacio, o la producción de antibióticos. Los mecanismos indirectos se basan en la inducción de cambios en la planta huésped que alteran la susceptibilidad de la planta al patógeno, por ejemplo induciendo resistencia sistémica en la planta.

Por otra parte, muchos microorganismos promotores del crecimiento vegetal presentan funciones de biocontrol. La observación de que la colonización de las raíces por hongos micorrícicos no siempre está asociada a una mejora de la nutrición y el crecimiento de las plantas ha llevado a la conclusión de que el aumento de la tolerancia a las tensiones bióticas es otro beneficio importante de la simbiosis. La mayor resistencia de las plantas micorrizadas a la infección por patógenos del suelo se ha relacionado con la acumulación de fitoalexinas, flavonoides e isoflavonoides en los tejidos radiculares colonizados por estos hongos. También se ha demostrado la protección biológica que ejercen los hongos micorrícicos sobre los nematodos parásitos de las plantas, por ejemplo, mediante la reducción de las poblaciones de *Meloidogyne incognita* o *Pratilenchus penetrans* (45% y 87%) en las raíces micorrizadas en comparación con las no micorrizadas. La complejidad o multifuncionalidad de la relación entre la planta huésped y los hongos micorrícicos quedó demostrada, por ejemplo, en un estudio en el que plantas de tomate micorrizadas en presencia del patógeno *Alternaria solani* mostraron síntomas de enfermedad significativamente menores que las plantas no micorrizadas, pero el aumento de las dosis de fertilizante fosfatado, en paralelo con la reducción de la formación de micorrizas, provocó un aumento de la gravedad de la enfermedad incluso en plantas micorrizadas. La inducción de la actividad de defensa por los hongos micorrícicos también se demostró en los órganos epigeos de la planta: por ejemplo, las larvas de la polilla del tomate (*Helicoverpa arimigera*) criadas en las hojas de plantas micorrizadas eran significativamente más pequeñas (62,3% de reducción de peso) que las criadas en plantas no micorrizadas.

En este marco, que engloba aspectos científicos, comerciales y normativos, adquiere gran importancia el desarrollo de herramientas de seguimiento de las especies microbianas introducidas, sobre todo para garantizar la correcta evaluación de los riesgos para el medio ambiente y la salud humana, pero también para evaluar su sostenibilidad, aspecto útil para determinar el método óptimo de aplicación (tiempo y dosis) que permita obtener la máxima eficacia. La investigación con este fin, que también utiliza métodos innovadores, está en curso, por lo que cabe esperar que se pongan a disposición de técnicos y agricultores sistemas de apoyo a la toma de decisiones (SAD) para mejorar la aplicación y la eficacia de los bioproductos.

En resumen, los problemas asociados a la eficacia insuficiente de los productos microbiológicos pueden deberse a que la tecnología de producción (elección de cepas, formulación, aplicación y supervivencia) no se ha desarrollado plenamente. La presión para reducir el uso de productos fitosanitarios químicos y fertilizantes procedentes de fuentes no renovables dará lugar a un mayor desarrollo y mejora de los productos microbianos, a pesar de sus limitaciones actuales, y se convertirán en una alternativa viable a los plaguicidas. También se espera que, con el progreso tecnológico y un mayor conocimiento de la viabilidad de los microorganismos introducidos en el medio ambiente, se superen las barreras actuales al uso de bioinoculantes.

Referencias

Bashan Y., Puente M.E., Rodriguez-Mendoza M.N., Toledo G., Holguin G., Ferrera-Cerrato R., Pedrin S. 1995. Survival of Azospirillum brasilense in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. Applied and Environmental Microbiology, 61(5), 1938-1945.

Bonaterra A., Badosa E., Daranas N., Francés J., Roselló G., Montesinos E. 2022. Bacteria as Biological Control Agents of Plant Diseases. Microorganisms, 10(9), 1759.

Deaker R., Roughley R.J., Kennedy I.R. 2004. Legume seed inoculation technology-a review. Soil biology and biochemistry, 36(8), 1275-1288.

de Faria M. R., Wraight S. P. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological control, 43(3), 237–256.

Elad Y. 2003. Biocontrol of foliar pathogens: mechanisms and application. Communications in agricultural and applied biological sciences, 68(4, PART A), 17–24.

Food and Agriculture Organization for the United Nations. NSP—Integrated Pest Management. Available online: http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/ipm/en/ (accessed on 15 July 2024)

Freimoser F. M., Rueda-Mejia M. P., Tilocca B., Migheli Q. 2019. Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 35 (10), 154.

Gilardi G., Tinivella F., Gullino M. L., Garibaldi A. 2005. Seed dressing to control *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* / Entwicklung eines Saatgutbehandlungsverfahrens zur Kontrolle von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. Zeitschrift Für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection, 112(3), 240–246.

Graham J.H., Strauss S.L. 2021. Biological control of soilborne plant pathogens and nematodes. In: Gentry T.J., Fuhrmann J.J., Zuberer D.A. (eds.) Principles and applications of soil microbiology. Third Edition. Elsevier, pp 633-654.

Haas D., Défago G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature reviews microbiology, 3(4), 307-319.

Handelsman J., Stabb E.V. 1996. Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. The Plant Cell, 8(10), 1855.

Jaroński S.T. 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. BioControl, 55,159–185.

Karpouzas D.K., Vryzas Z., Martin-Laurent F. 2021. Pesticide soil microbial toxicity: setting the scene for a new pesticide risk assessment for soil microorganisms. (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry, 94(10), 1161-1194.

Kowalska J., Tyburski J., Matysiak K., Tylkowski B., Malusà E. 2020. Field exploitation of multiple functions of beneficial microorganisms for plant nutrition and protection: real possibility or just a hope? Frontiers in Microbiology, 11, 1904.

Kowalska J. Krzymińska J. Tyburski J. 2022. Yeasts as a Potential Biological Agent in Plant Disease Protection and Yield Improvement—A Short Review. Agriculture, 12(9), 1404.

Malusà E., Berg G., Biere A., Bohr A., Canfora L., Jungblut A.D., Kępka W., Kinzle J., Kusstatscher P., Masquelier S., Pugliese M., Razinger J., Tommasini M.G., Vassilev N., Mayling N.V., Xu X., Mocali S. 2021. A holistic approach for enhancing the efficacy of soil microbial inoculants in agriculture: from lab to field scale. Global Journal of Agricultural Innovation, Research & Development, 8, 176-190.

Minchev Z., Kostenko O., Soler R., Pozo M.J. 2021. Microbial consortia for effective biocontrol of root and foliar diseases in tomato. Frontiers in Plant Science, 12, 756368.

Pandit M.A., Kumar J., Gulati S., Bhandari N., Mehta P., Katyal R., Rawat, C.D., Mishra, V., Kaur J. 2022. Major biological bontrol strategies for plant pathogens. Pathogens, 11(2): 273.

Panth M., Hassler S.C., Baysal-Gurel F. (2020). Methods for management of soilborne diseases in crop production. Agriculture, 10(1), 16.

Ptaszek M., Canfora L., Pugliese M., Pinzari F., Gilardi G., Trzciński P., Malusà E. 2023. Microbial-Based Products to Control Soil-Borne Pathogens: Methods to Improve Efficacy and to Assess Impacts on Microbiome. Microorganisms, 11(1), 224.

Pugliese M., Liu B.P., Gullino M.L., Garibaldi A. 2008. Selection of antagonists from compost to control soil-borne pathogens. Journal of Plant Diseases and Protection, 115, 220–228.

Regulation (EC) No 1107/2009 concerning the placing of plant protection products on the market. Available online: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/1107/oj (accessed on 15 July 2024).

Regulation (EC) No 396/2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin. Available online: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2005/396/oj (accessed on 15 July 2024).

Rostas M., Hilker M. 2003. Indirect interactions between a phytopathogenic and an entomopathogenic fungus. Naturwissenschaften, 90, 63–67

Sarma B.K., Yadav S.K, Singh S., Singh H.B. 2015. Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: Readdressing for enhancing efficacy. Soil Biology & Biochemistry 87, 25-33.

Sellitto V.M., Zara S., Fracchetti F., Capozzi V., Nardi T. 2021. Microbial biocontrol as an alternative to synthetic fungicides: boundaries between pre- and postharvest applications on vegetables and fruits. Fermentation 7(2), 60.

Świechowski W., Doruchowski G., Trzciński P. 2012. Effect of spray application parameters on viability of bacterium Pseudomonas fluorescens used as bio-pesticide in organic fruit production. In: Granatstein D., Andrews P. (eds.) Proc. II Int. Congress on Organic Fruit Research Symposium. ISHS, Leavenworth WA, USA, pp. 18-21.

Trivedi P., Leach J.E., Tringe S.G., Sa T., Singh B.K., 2020. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. Nature reviews microbiology, 18(11), 607–621.

Waghunde R.R., Shelake R.M., Sabalpara A.N. 2016. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. African Journal of Agricultural Research, 11(22): 1952-1965.

Zimmermann G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. Biocontrol Science and Technology, 17(6),533–596.

Zin N.A., Badaluddin N.A. 2020. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. Annals of Agricultural Sciences 65(2), 168-178.

Capítulo 3. Microorganismos promotores del crecimiento vegetal

Samuel Bickel[1], Paweł Trzciński[2], Stefano Mocali[3]

[1]Universidad Tecnológica de Graz, Petersgasse 12, 8010 Graz, AUSTRIA
[2]Instituto de Horticultura - Instituto Nacional de Investigación, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, POLONIA
[3]Consejo de Investigación y Economía Agrarias, Centro de Investigación para la Agricultura y el Medio Ambiente, Via di Lanciola 12/A, 50125 Cascine del Riccio, ITALIA

Los microorganismos específicos del suelo, la rizosfera y las plantas desempeñan un papel crucial en la promoción del crecimiento de las plantas y la agricultura. En este capítulo explicamos cómo los microorganismos de uso común y las cepas comerciales pueden promover el crecimiento de las plantas. Abordamos la explotación y selección de prebióticos, probióticos y postbióticos para promover el crecimiento de las plantas y mejorar la fertilidad y la salud del suelo. Por último, se discuten los aspectos prácticos para la correcta aplicación de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal.

1. Microorganismos capaces de favorecer el crecimiento de las plantas

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM por sus iniciales en inglés) son un grupo clave de bacterias y hongos predominantemente que contribuyen significativamente a potenciar el crecimiento de las plantas (Glick 2012). La utilización de cepas comerciales de PGPM y la investigación en curso sobre nuevos microorganismos pueden mejorar nuestra comprensión de cómo pueden aprovecharse estos microbios beneficiosos para mejorar la sostenibilidad agrícola y la productividad de los cultivos. Los tres grupos principales de PGPM son: (1) rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal que colonizan la superficie de las raíces de las plantas, (2) bacterias endofíticas que viven en el interior de la planta huésped, y (3) hongos micorrícicos que forman relaciones simbióticas con las raíces de las plantas. En la figura 3.1 se ilustran las principales funciones que desempeñan los PGPM y su asociación con la planta huésped.

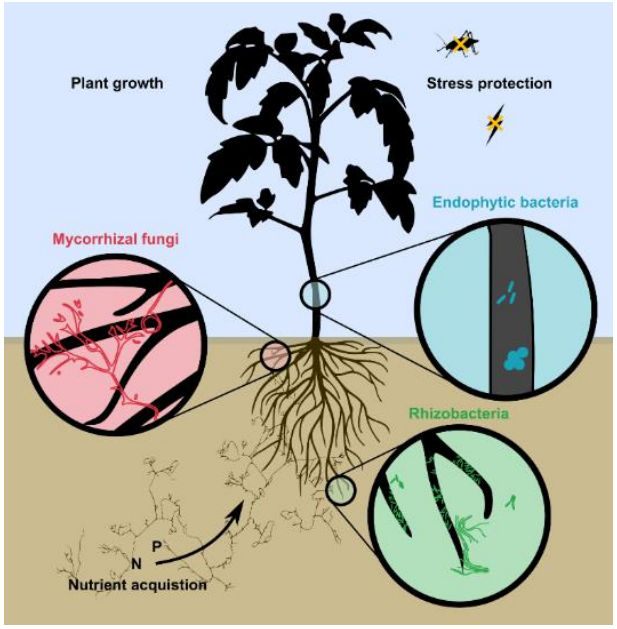

Fig. 3.1. Tres grupos principales de microorganismos promotores del crecimiento vegetal.

Además, la diversidad microbiana del suelo y de las plantas desempeña un papel crucial en la promoción del crecimiento vegetal a través de diversos mecanismos que benefician la salud y el desarrollo de las plantas. Una comunidad microbiana diversa en la rizosfera puede aumentar la disponibilidad de nutrientes para las plantas. Esta comunidad diversa incluye microorganismos capaces de promover el crecimiento de las plantas facilitando la absorción y el ciclo de los nutrientes. Una elevada diversidad taxonómica y funcional microbiana en la rizosfera está asociada a la supresión de enfermedades causadas por patógenos del suelo y puede promover el crecimiento de las plantas. La diversidad y la actividad de las comunidades microbianas pueden contribuir a mejorar el rendimiento de las plantas y a reducir la incidencia de enfermedades, favoreciendo en última instancia el crecimiento y la salud de las plantas. La abundancia de microbios beneficiosos en el suelo está positivamente correlacionada con la calidad del suelo, lo que conduce a un mejor crecimiento de las plantas, una menor incidencia de enfermedades y un mejor contenido de nutrientes. La presencia de diversas comunidades microbianas influye en las propiedades biológicas y químicas del suelo y contribuye a mejorar la salud de las plantas y el funcionamiento general del ecosistema. Asimismo, la comunidad microbiana subterránea puede influir en la dinámica de la comunidad vegetal y en los procesos ecosistémicos. Además, las interacciones entre las plantas y una comunidad microbiana diversa pueden moldear los rasgos de las plantas e influir en su adaptación a lo largo del tiempo.

Las intrincadas interacciones entre las plantas y las diversas comunidades microbianas subrayan la importancia de la diversidad microbiana para la salud de las plantas y el funcionamiento de los ecosistemas.

1.1. Modo de acción: ¿cómo promueven los microorganismos el crecimiento de las plantas?

Como ya se ha mencionado, los microorganismos desempeñan un papel crucial en la promoción del crecimiento de las plantas a través de diversos mecanismos. Estos mecanismos incluyen la producción de fitohormonas, ayudando en la adquisición de nutrientes, proporcionando resistencia sistémica contra patógenos y ofreciendo protección contra el estrés a las plantas.

Fitohormonas

Una de las principales formas en que los microorganismos promueven el crecimiento de las plantas es mediante la producción de fitohormonas. Las fitohormonas son moléculas señalizadoras que regulan diversos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas. Muchos PGPM pueden sintetizar fitohormonas como auxinas, citoquininas y giberelinas, que influyen en los procesos de crecimiento de las plantas. Por ejemplo, se ha descrito que *Azotobacter spp.*, *Rhizobium spp.*, *Pantoea agglomerans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Paenibacillus polymyxa* sintetizan citoquininas, que son fitohormonas esenciales que influyen en los procesos de crecimiento de las plantas como la división, elongación y diferenciación celular (Glick 2012). Varias especies bacterianas pueden producir compuestos indólicos como la fitohormona auxina ácido indol-3-acético (IAA), que desempeña un papel importante en las interacciones bacteria-planta y puede estimular el crecimiento de las plantas (Souza et al. 2015). La producción de IAA por *Pseudomonas putida* se ha asociado con aumentos significativos en los parámetros de crecimiento de la planta y el rendimiento en plantas de tomate. Otros taxones, como las especies de Bacilli asociadas con la rizosfera del trigo (incluyendo *Bacillus endophyticus*, *Paenibacillus xylanexedens*, *Planococcus citreus*, *Planomicrobium okeanokoites*, *Sporosarcina sp.* y *Staphylococcus succinus*) exhiben atributos multifuncionales que promueven el crecimiento de las plantas, incluyendo potencialmente la

producción de fitohormonas. Las PGPM que pueden sintetizar fitohormonas pueden contribuir a mejorar el crecimiento y el desarrollo de las plantas a través de múltiples mecanismos.

Adquisición de nutrientes

Otro modo de acción esencial por el que los microorganismos mejoran el crecimiento de las plantas es a través del fomento de la adquisición de nutrientes por parte de éstas. Por ejemplo, los PGPM pueden solubilizar minerales que contienen fósforo, fijar el nitrógeno atmosférico y producir sideróforos con efecto quelante para hacer el hierro más accesible a las raíces de las plantas. Al mejorar la disponibilidad de nutrientes, estos microorganismos favorecen el crecimiento y desarrollo general de las plantas. Los inoculantes microbianos con propiedades promotoras del crecimiento radicular y movilizadoras de nutrientes se han propuesto como estrategia para mejorar la adquisición de nutrientes por parte de las plantas. Al interactuar con fertilizantes orgánicos e inorgánicos, estos inoculantes pueden facilitar la absorción de nutrientes por las plantas y contribuir a mejorar su crecimiento y desarrollo. Se ha informado de que ciertas rizobacterias beneficiosas aumentan la absorción de nutrientes por las plantas al mejorar la eficiencia de la absorción de nitrógeno de los fertilizantes, como demuestran los estudios que utilizan técnicas isotópicas de N^{15} para rastrear el movimiento del nitrógeno en los tejidos vegetales. Curiosamente, los inoculantes microbianos que contienen *Bacillus spp.* y hongos micorrícicos arbusculares (HMA) pueden mejorar el crecimiento y el rendimiento de las plantas, lo que se traduce en una mayor eficiencia en la absorción de nutrientes. Estos PGPM pueden ayudar a las plantas a extraer más nutrientes, incluidos nitrógeno, fósforo y potasio, del suelo, mejorando así la adquisición de nutrientes. Por otro lado, las *Sphingomonas spp.* que producen auxinas y sideróforos pueden mejorar el crecimiento de las plantas y la absorción de nutrientes estimulando el desarrollo de pelos radiculares y raíces laterales. Las diversas interacciones de PGPM desempeñan un papel importante en la mejora de la adquisición de nutrientes por parte de las plantas, promoviendo en última instancia un mejor crecimiento, una mayor eficiencia en la absorción de nutrientes y la salud general de las plantas.

Protección frente al estrés biótico y resistencia sistémica

Los microorganismos también pueden contribuir al crecimiento de las plantas induciéndoles una resistencia sistémica. De hecho, los PGPM pueden activar los mecanismos de defensa de las plantas, haciéndolas más resistentes a patógenos y enfermedades. Esta respuesta de resistencia sistémica ayuda a las plantas a combatir diversas tensiones y a mantener su salud y vigor (Vacheron et al. 2013). Los PGPM han sido identificados como inductores de resistencia sistémica en las plantas a través de varios mecanismos, incluyendo la producción de sideróforos, la secreción de antibióticos, la generación de fitohormonas y la activación de vías de resistencia sistémica. La capacidad de los PGPM para producir sideróforos contribuye a sus efectos antagonistas contra los patógenos y apoya aún más la inducción de resistencia sistémica en las plantas. La resistencia sistémica inducida por las bacterias de la rizosfera confiere resistencia de amplio espectro, mejorando la capacidad de las plantas para defenderse contra diferentes tipos de patógenos y se ha observado en una serie de especies de plantas como arabidopsis, judía, clavel, pepino, rábano, tabaco y tomate. Aquí, también la diversidad microbiana en contacto con la planta desempeña un papel clave porque ofrece variabilidad para "entrenar" el sistema inmunitario de la planta. Al desencadenar una resistencia sistémica inducida, los PGPM pueden potenciar los mecanismos de defensa de la planta y mejorar su resistencia frente a los ataques de patógenos.

Protección contra el estrés abiótico

Además, los microorganismos protegen a las plantas del estrés, especialmente en condiciones ambientales adversas. Al colonizar la rizosfera e interactuar con las raíces de las plantas, los PGPM pueden ayudarlas a tolerar estreses abióticos como la sequía, la salinidad y la toxicidad por metales pesados. Esta capacidad de protección contra el estrés aumenta la resistencia de las plantas y garantiza su supervivencia en entornos difíciles. Se ha demostrado que las bacterias de la rizosfera aisladas de entornos difíciles mejoran la tolerancia del trigo a la sequía. Estas bacterias aumentan la producción de biomasa y reducen las emisiones de volátiles de estrés, lo que contribuye a aumentar la resistencia de las plantas a la sequía. La biopelícula de bacterias de la rizosfera, junto con el mantillo del suelo, desempeña un papel protector contra el estrés por sequía (Timmusk et al. 2014). Por ejemplo, *Paenibacillus polymyxa* aislado del microbioma de la rizosfera de cebada silvestre en el norte de Israel demostró la capacidad de mejorar la resiliencia de las plantas a las condiciones de sequía, destacando su potencial para promover la resistencia a la sequía en los cultivos. Asimismo, *Stenotrophomonas rhizophila* y otros microbios beneficiosos demuestran una gran capacidad para colonizar los tejidos radiculares, lo que permite a las bacterias interactuar estrechamente con la planta huésped, facilitando potencialmente el intercambio de compuestos beneficiosos y mejorando la tolerancia de la planta al estrés. Se ha demostrado que *S. rhizophila* presenta una marcada tolerancia a la salinidad mediante la producción de osmoprotectores muy eficaces, como el glucosilglicerol, la trehalosa y la espermidina, que ayudan a la supervivencia de las plantas en condiciones ambientales adversas. Estos agentes protectores contra el estrés promueven el crecimiento de las plantas y ayudan a la protección de las raíces, contribuyendo a mejorar la resistencia de las plantas frente a diversos factores de estrés (Alavi et al. 2013). En resumen, los PGPM emplean una combinación de mecanismos, como la producción de osmoprotectores, la mejora de la adaptabilidad ambiental, la protección de las raíces contra el estrés y la colonización de los tejidos radiculares, para proteger a las plantas del estrés y promover su crecimiento y supervivencia en entornos difíciles.

1.2. Cepas comerciales de PGPM: de la investigación a la aplicación

En el ámbito de la investigación, los científicos exploran continuamente nuevas cepas de microorganismos con capacidad para promover el crecimiento de las plantas. Estas cepas "de investigación" se someten a una evaluación rigurosa para comprender sus mecanismos de acción, su eficacia para potenciar el crecimiento vegetal y sus posibles aplicaciones en la agricultura. Mediante el estudio de estas cepas, los investigadores pretenden ampliar la base de conocimientos sobre las interacciones planta-microbio y desarrollar estrategias innovadoras para la producción sostenible de cultivos. Los inoculantes basados en PGPM han mostrado resultados prometedores en la reducción de las tasas de aplicación de fertilizantes químicos y se están evaluando como componentes de estrategias integradas de gestión de nutrientes. (Adesemoye et al. 2009).

En la agricultura comercial, el uso de cepas específicas de PGPM ha cobrado importancia. Estas cepas comerciales se seleccionan por su eficacia para promover el crecimiento de las plantas y mejorar el rendimiento de los cultivos. Aprovechando los efectos beneficiosos de estos microorganismos, los agricultores pueden aumentar la productividad y la sostenibilidad de sus prácticas agrícolas. Entre los PGPM más populares utilizados comercialmente están *Rhizobia*, *Pseudomonas spp.*, *Azotobacter spp.*, *Bacillus spp.*, *Trichoderma spp.*, *Aspergillus spp. y Glomus spp*, y *Glomus spp*. Estos inoculantes microbianos disponibles en el mercado se utilizan habitualmente como biofertilizantes o productos biofortificantes que contienen una

sola especie o múltiples cepas de microorganismos beneficiosos que han sido ampliamente estudiados por su capacidad para promover el crecimiento de las plantas, mejorar la absorción de nutrientes, aumentar la tolerancia de las plantas frente al estrés y contribuir a la producción sostenible de cultivos en agroecosistemas de pequeños agricultores. La Tabla 1 ofrece una visión general de los PGPM más comunes, sus mecanismos de acción y los beneficios que ofrecen a las plantas.

Tab. 1. Microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM) más comunes.

Microorganismo	Mecanismos de acción	Beneficios para las plantas	Ejemplo
Rizobacterias	• Producción de fitohormonas • Solubilización de nutrientes (por ejemplo, fósforo) • Inducción de resistencia sistémica	• Mayor crecimiento y desarrollo de las plantas • Mejor absorción de nutrientes • Mayor resistencia a los agentes patógenos	El *Bacillus subtilis* produce fitohormonas como las auxinas, solubiliza nutrientes como el fósforo e induce resistencia sistémica en las plantas.
Bacterias endofíticas	• Establecimiento de asociaciones estrechas con las plantas • Producción de sustancias promotoras del crecimiento	• Mayor crecimiento de las plantas • Protección contra enfermedades y estrés	*Pseudomonas fluorescens* establece relaciones simbióticas con las plantas, segrega sustancias que favorecen el crecimiento, como el ácido indol acético (IAA), y contribuye a la absorción de nutrientes.
Hongos micorrícicos (arbusculares)	• Facilita la absorción de nutrientes, especialmente el fósforo. • Aumento de la tolerancia de las plantas al estrés	• Mejor adquisición de nutrientes • Mayor resistencia de las plantas a los retos medioambientales	*Rhizophagus irregularis* (antes *Glomus intraradices*) forma asociaciones micorrícicas arbusculares con las raíces de las plantas, lo que facilita la absorción de fósforo y aumenta la tolerancia de las plantas al estrés.

2. Aprovechamiento de los prebióticos, probióticos y postbióticos para promover el crecimiento de las plantas y mejorar la fertilidad y la salud del suelo.

Durante los últimos 20-30 años, se ha aislado, caracterizado y probado un gran número de PGPM como biofertilizantes y agentes de biocontrol en condiciones controladas y naturales. Los resultados confirmaron el efecto beneficioso de los microorganismos seleccionados sobre el crecimiento y la salud de las plantas, el aumento del contenido de nutrientes y la mejora de las propiedades del suelo, como se ha expuesto en la sección anterior. En la actualidad, la actividad científica en el campo de los inoculantes microbianos se centra en el desarrollo de formulaciones microbianas eficientes y respetuosas con el medio ambiente y en el análisis de cómo los microorganismos introducidos afectan a la comunidad microbiana, a la diversidad y a las interacciones específicas entre plantas y microorganismos.

En este marco, las actividades del proyecto EXCALIBUR[1] abordaron la biodiversidad desde diversos ángulos, centrándose en la salud del suelo en la horticultura, reforzando así la intersectorialidad para integrar a los seres humanos, los suelos, las plantas y los ecosistemas hacia un enfoque de "Una Sola Salud". Teniendo en cuenta la complejidad del sistema del suelo, hemos ido más allá de la visión simplificada de las interacciones individuales planta-microbio o suelo-planta y consideramos los factores clave que influyen en este complejo ecosistema, incluyendo la planta, el suelo y los organismos del suelo como un "metaorganismo" único capaz de mediar e influir en los diversos intercambios (flujos) que contribuyen a la salud y la productividad de las plantas. Así pues, se ha aplicado una combinación de prebióticos, probióticos y postbióticos para gestionar y estimular el microbioma beneficioso del suelo nativo. En resumen, hemos promovido "artificialmente" las funciones biológicas y la diversidad del suelo integrando prácticas de gestión con formulaciones de nuevo desarrollo que contienen bioinóculos microbianos beneficiosos ("enfoque probiótico") y bioefectores ("enfoque prebiótico"), para entender cómo afectan a la productividad de los cultivos la biodiversidad del suelo y la fertilidad. El "enfoque prebiótico" se refiere a la mejora de las capacidades de las plantas para explotar la biodiversidad circundante mediante la estimulación de la microbiota del suelo y los endófitos, mientras que el "enfoque probiótico" introduce microorganismos beneficiosos en el suelo/cultivo para mejorar la nutrición o la protección de las plantas. EXCALIBUR abordó este reto mediante un enfoque sistémico, evaluando: (i) cómo afectan los sistemas de cultivo a la biodiversidad del suelo y a su dinámica; (ii) cómo influye la biodiversidad autóctona en la eficacia de los nuevos bioproductos, especialmente en términos de nutrición y protección de las plantas, y (iii) cómo pueden mejorarse las estrategias de gestión de cultivos con bioinóculos para garantizar beneficios constantes a los agricultores a nivel de explotación y la protección pertinente de la biodiversidad a nivel regional/de la tierra.

La aplicación de una estrategia que integre prebióticos, probióticos y postbióticos puede reportar varios beneficios para el crecimiento de las plantas y la fertilidad del suelo. Los prebióticos y postbióticos mejoran la disponibilidad de nutrientes para las plantas, suprimen enfermedades, mejoran la estructura del suelo y la tolerancia al estrés. En general, contribuyen a la agricultura sostenible al promover un microbioma del suelo sano, reducir la dependencia de fertilizantes y pesticidas químicos y aumentar la resistencia de las plantas a las agresiones medioambientales. Sin embargo, es esencial tener en cuenta factores como la compatibilidad microbiana, los métodos de aplicación y las condiciones ambientales a la hora de aplicar estrategias

[1] https://cordis.europa.eu/project/id/817946

prebióticas, probióticas y postbióticas en la agricultura. La investigación en curso es necesaria para optimizar estos enfoques y comprender sus efectos a largo plazo sobre la salud del suelo y la productividad de las plantas.

2.1. ¿Cómo seleccionar un prebiótico, probiótico o postbiótico beneficioso para las plantas?

Basándose en las consideraciones anteriores, podrían seleccionarse tres estrategias para la gestión microbiana de los sistemas suelo-planta basadas en prebióticos, probióticos y postbióticos (Fig. 3.2.).

Prebióticos

Los prebióticos son productos que mejoran la diversidad microbiana y la salud del suelo promoviendo el crecimiento de los microorganismos del suelo ya presentes en el sistema suelo-planta. Los prebióticos son productos naturales, normalmente residuos agroindustriales, como el biocarbón, los lodos de depuradora, el compost, el humus, el estiércol animal y los residuos con quitina, entre otros, que mejoran (sobre todo en suelos degradados) la estructura del suelo, la actividad bioquímica y aumentan la población y la diversidad microbianas. Sin embargo, el compost y el estiércol animal pueden considerarse productos "*simbióticos*", ya que contienen microorganismos (algunos de ellos con propiedades beneficiosas). Los inoculantes basados en la fermentación en estado sólido también pueden definirse como simbiontes, ya que son mezclas multifuncionales de materia orgánica mineralizada (con funciones tanto prebióticas como de soporte) y microorganismos beneficiosos para las plantas (con funciones probióticas de promoción del crecimiento de las plantas o de biocontrol) (Vassileva et al. 2020). Por ejemplo, cuando el microorganismo probiótico es un agente solubilizador de fósforo, la mezcla simbiótica podría enriquecerse adicionalmente con fósforo disponible para la planta. Se observaron características simbióticas similares en inoculantes microbianos encapsulados en geles naturales en presencia de aditivos con acción estimulante microbiana beneficiosa.

Probióticos

Los probióticos son comúnmente aceptados como microorganismos beneficiosos que ejercen propiedades promotoras de la salud y movilizadoras de nutrientes. Una vez introducidos en el suelo, los probióticos deben desarrollar un nivel crítico de biomasa para ejercer sus rasgos beneficiosos para las plantas. Resultan especialmente atractivas las bacterias con una elevada actividad enzimática (ACC-deaminasa), producción de fitohormonas (auxinas, citoquininas, giberelinas), metabolitos osmóticos (por ejemplo, trehalosa, glicina betaína). Como el crecimiento microbiano depende de las características suelo-planta y de las condiciones ambientales, parece difícil que un solo microorganismo o un consorcio microbiano alcance el número crítico de células necesario. Por ello, tras un largo periodo de estudios sobre aislamiento, selección y caracterización de PGPM, los investigadores se centran en el desarrollo de procesos biotecnológicos económicos para la producción y formulación de biomasa/esporas que garanticen la supervivencia y el crecimiento del inóculo. Una de las técnicas de formulación más prometedoras es la encapsulación en macro y microperlas de polisacáridos, que garantiza un suministro continuo del inoculante en el suelo, evitando el efecto de los factores de estrés del suelo y del medio ambiente, incluida la comunidad microbiana autóctona. Deberían desarrollarse inoculantes dobles/múltiples combinados con bioestimulantes y otros aditivos, incluidas semillas (bioformulados inteligentes todo en uno) para completar los fertilizantes químicos tradicionales. Otra opción, para evitar problemas durante cada fase de producción, formulación, almacenamiento y

establecimiento/acción de los PGPM en el suelo, es utilizar sus metabolitos beneficiosos para las plantas (postbióticos).

Postbióticos

Los postbióticos son subproductos metabólicos o sustancias producidas por PGPM, que ejercen efectos específicos de promoción del crecimiento y/o biocontrol en las plantas, evitando así los riesgos asociados a la aplicación de células microbianas. Ejemplos específicos de estos metabolitos son las fitohormonas, los volátiles y los compuestos anti-inducción. ¿Cuáles son los riesgos de utilizar microorganismos en sistemas suelo-planta? Los procedimientos incorrectos de formulación sin osmoprotectores, protectores UV, cargas con valor nutritivo y otros aditivos beneficiosos para las plantas pueden provocar resultados incoherentes en condiciones de campo. Otros riesgos incluyen diversos factores abióticos y bióticos, que afectan a la tasa de colonización microbiana, la presencia de otros componentes más competentes de la población microbiana, el nivel de necesidades de la planta y la capacidad de atraer y alimentar a los microorganismos beneficiosos. Es importante señalar que los protocolos de aplicación sobre el terreno de los PBM no garantizan que éstos encuentren su nicho de establecimiento y función. Además, aún no está claro qué tipo de metabolitos liberarán los microorganismos introducidos en el sistema suelo-planta. Este complejo conjunto de condiciones determina la tasa de supervivencia de los inoculantes y el desempeño de sus funciones objetivo (Kaminsky et al. 2019). Analizando todos estos aspectos, parece que los microorganismos endofíticos están mejor protegidos de las condiciones ambientales adversas y, además, son más eficientes funcionalmente.

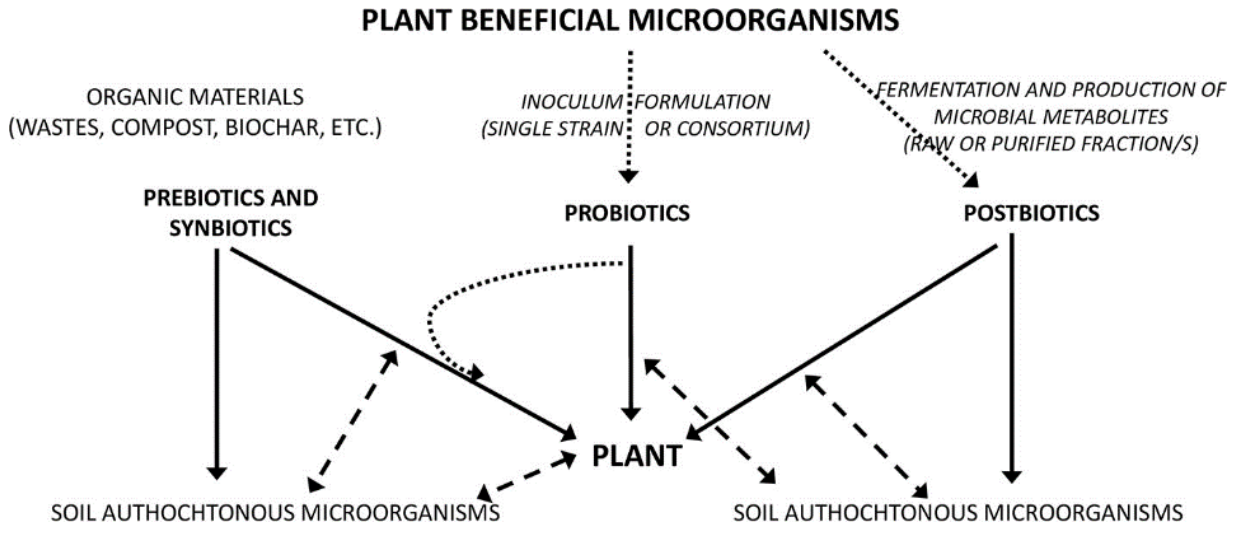

Fig. 3.2. - Diagrama que muestra las tres estrategias para la gestión microbiana del suelo y las plantas basadas en enfoques prebióticos, probióticos y postbióticos. Las líneas llenas muestran el efecto directo, las líneas discontinuas las interacciones y las líneas de puntos los procesos de formulación/producción (fuente: Vassileva et al. 2020).

3. Aspectos prácticos para la correcta aplicación de microorganismos promotores del crecimiento vegetal

Dado que los microorganismos son seres vivos, el producto basado en ellos debe aplicarse adecuadamente para mantener vivos a los organismos. Hay muchos aspectos cruciales que afectan a la supervivencia y eficacia de los inóculos bacterianos y fúngicos, pero existen algunas reglas generales:

1. Las condiciones adecuadas de almacenamiento - La exposición de los preparados a temperaturas altas o bajas, a la luz intensa o a la humedad podría disminuir rápidamente el recuento de células viables en el producto.
2. El uso depende del tipo de microorganismo: algunos microorganismos beneficiosos, como los hongos micorrícicos arbusculares (HMA), deben aplicarse directamente en el suelo, preferiblemente cerca de la zona radicular, mientras que otros, que actúan como agentes de control biológico de contacto directo o endofitos, pueden pulverizarse sobre las hojas u otras partes de las plantas.
3. Las condiciones meteorológicas deben ser adecuadas para el uso de los microorganismos: la aplicación de los productos que contienen microbios debe ser similar al uso de productos fitosanitarios (evitar temperaturas altas o bajas, lluvia, etc.).
4. Algunas prácticas agrotécnicas podrían disminuir la eficacia de los inóculos microbianos; por ejemplo, la fertilización, especialmente con fósforo, inhibirá el crecimiento de los HMA, y la aplicación al mismo tiempo de productos fitosanitarios y de microorganismos beneficiosos podría destruir parte o la totalidad de los microbios.
5. A diferencia de los productos de protección química o los fertilizantes, los productos a base de microorganismos no son de acción rápida y deben utilizarse con fines preventivos. Además, los agentes de control biológico no actúan como fungicidas sistémicos, por lo que no pueden utilizarse para "eliminar" los patógenos de las plantas.

Los métodos de tratamiento pueden dividirse en función de su finalidad, es decir: aplicación por pulverización, tratamiento del suelo o tratamiento de semillas. Además, en algunos casos, el tratamiento diferirá entre el cultivo en campo y en invernadero.

La pulverización se utiliza principalmente para tratar las partes aéreas de las plantas. Debido a las duras condiciones de exposición de las plantas a la luz solar, la falta de fuentes de nutrientes y la desecación, los tratamientos deben repetirse varias veces durante la temporada vegetativa. La excepción a esta regla son las bacterias endofíticas, por ejemplo, del género *Methylobacterium*. También existe la posibilidad de aplicar un inóculo en la superficie del suelo para enriquecerlo con microorganismos beneficiosos. Sin embargo, este método tiende a ser ineficaz, ya que los microbios tendrán problemas para penetrar en el suelo y/o alcanzar la zona radicular. La ventaja del método de pulverización es que es fácil de realizar con el uso de maquinaria agrícola común. Sin embargo, existen restricciones en cuanto al uso de este método. La circulación prolongada e intensa de líquido en el sistema de líquido del pulverizador inducirá la muerte de las células bacterianas debido a daños mecánicos (Doruchowski et al. 2015). Además, el tamaño de la tasa de aerosolización (la menor supervivencia se relacionó con las gotas más pequeñas), la temperatura (la mayor supervivencia se observó a 12 °C) y la humedad relativa (el nivel óptimo de humedad fue del 70-80%) podrían influir en la supervivencia de las células bacterianas (Marthi et al. 1990).

El tratamiento de semillas se realiza para inocular plantas con microorganismos simbióticos, protegerlas de patógenos o acelerar la germinación de las semillas. Existen varios métodos de tratamiento de semillas, pero en general, este método se basa en recubrir las semillas con inóculo mezclado con agentes aglutinantes y, opcionalmente, con protectores celulares. Se suele utilizar para inocular plantas con hongos micorrícicos arbusculares o legumbres con bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno como *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Además, las semillas podrían tratarse con algunos agentes de control biológico como *Trichoderma* spp o *Bacillus* spp para disminuir la posibilidad de infestación por patógenos vegetales. Aparte

de la inoculación de las semillas, la misma técnica podría utilizarse para tratar las plántulas durante el trasplante o antes de plantarlas. La ventaja del tratamiento de semillas o plántulas con bacterias u hongos simbióticos es que, en la mayoría de los casos, la inoculación se realiza una sola vez y, en la mayoría de los casos, el tratamiento de las semillas podría realizarse con el uso de maquinaria sencilla. En cambio, el tratamiento de plántulas es más complicado, ya que las plantas jóvenes son frágiles y requieren mano de obra humana o equipos especializados.

La aplicación en el suelo se utiliza para aplicar los microbios beneficiosos directamente en la zona radicular de las plantas o en el suelo a granel. Otro método consiste en mezclar los microorganismos con el sustrato de cultivo para enriquecerlo con las bacterias u hongos beneficiosos (más común en condiciones de invernadero) antes de plantar las plantas o semillas. La aplicación de microorganismos en el suelo a granel (con fertilizantes especiales o como preparado microbiano) podría realizarse fácilmente con el uso de maquinaria agrícola común. Sin embargo, debido a limitaciones económicas, la dosis de los preparados comerciales, dependiendo de la formulación, suele ascender a varios kilogramos o litros por hectárea. Por lo tanto, la proporción de microorganismos aplicados por cm^3 de suelo es baja, ya que el inóculo se distribuye por toda la superficie del campo (es decir, en los lugares donde hay plantas y en los lugares donde no las hay). En cambio, la incorporación directa del inóculo en la zona radicular permite una mayor concentración de microbios en el lugar donde pueden influir en las raíces o afectar al microbioma de la rizosfera. Así, con una mayor concentración en el suelo, los microorganismos introducidos tienen más posibilidades de éxito. Por ejemplo, en el proyecto EXCALIBUR, el agente de control biológico a base de *Trichoderma* se aplicó a los hoyos de plantación justo antes de plantar los plantones. Tras la estación vegetativa, la población de hongos en el suelo tratado estaba dominada por el hongo introducido (Fig. 3.3.). Sin embargo, este método es difícil de realizar en plantas ya en crecimiento y requiere mucho trabajo y tiempo cuando se aplican microorganismos a plántulas trasplantadas. Los microorganismos más utilizados en la aplicación al suelo son los HMA, las bacterias fijadoras de nitrógeno, los solubilizadores de fósforo y los agentes de control biológico.

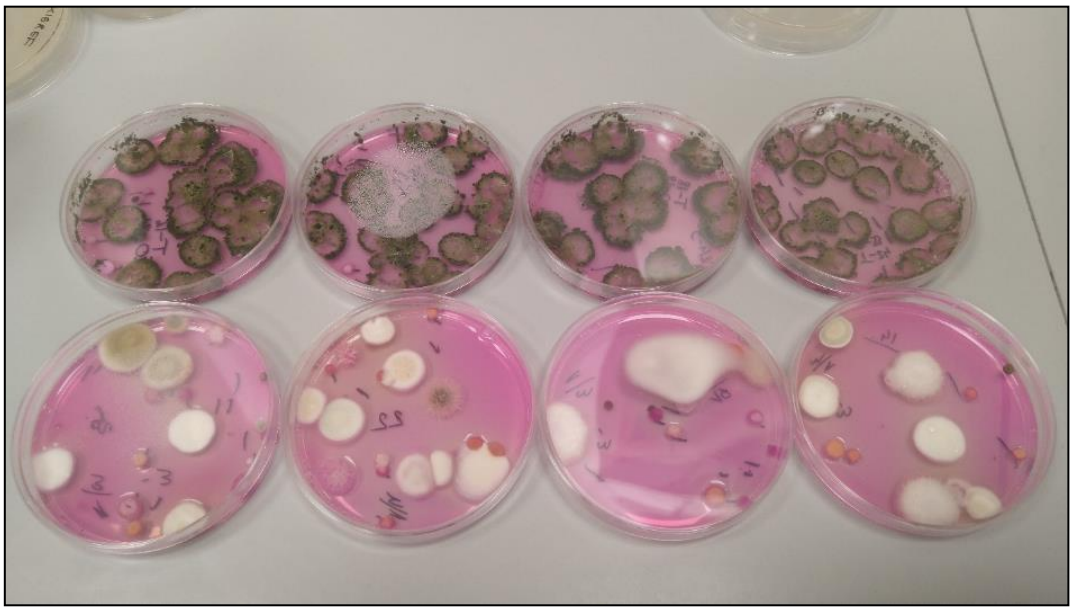

Fig. 3.3. Comparación de las poblaciones de hongos en el suelo tratado con Trichoderma *(fila superior de placas) y en el suelo de control no tratado (fila inferior de placas). Las colonias verdes pertenecen al género* Trichoderma*.*
Autor: Paweł Trzciński.

Otro tipo de aplicación al suelo es la introducción de microorganismos mediante sistemas de fertirrigación. Este método es fácil de realizar, ya que los microorganismos se introducen en las plantas con el agua de riego. Sin embargo, la desventaja de este método es que sólo se pueden utilizar formulaciones hidrosolubles y, después de cada aplicación, todos los elementos del sistema de riego deben enjuagarse con agua para limpiarlos de los residuos del inóculo. Los productos microbianos, aparte de las bacterias o los hongos, contienen los portadores o agentes de carga que a menudo podrían ser utilizados por los microorganismos como alimento y fuente de energía. Como resultado, algunas partes del sistema de riego, especialmente los emisores de goteo, podrían verse obstruidos por la biomasa. Los microorganismos más comunes encontrados en los emisores de goteo obstruidos son hongos del género *Trichoderma* (Boari et al. 2008; Trzcinski et al. 2013).

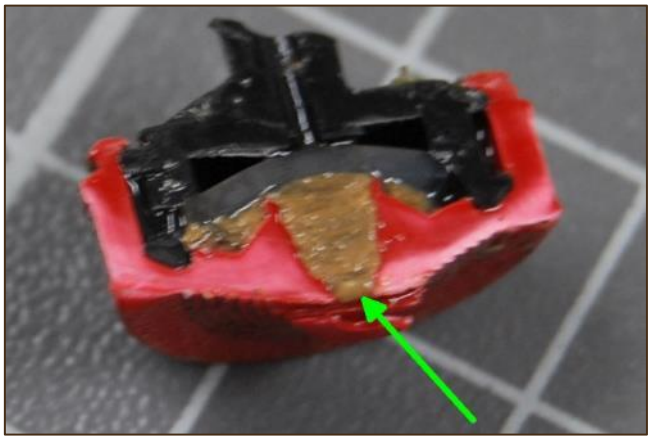

Fig 3.4. Emisor de goteo obstruido por biomasa de origen fúngico.
Autor: Paweł Trzciński.

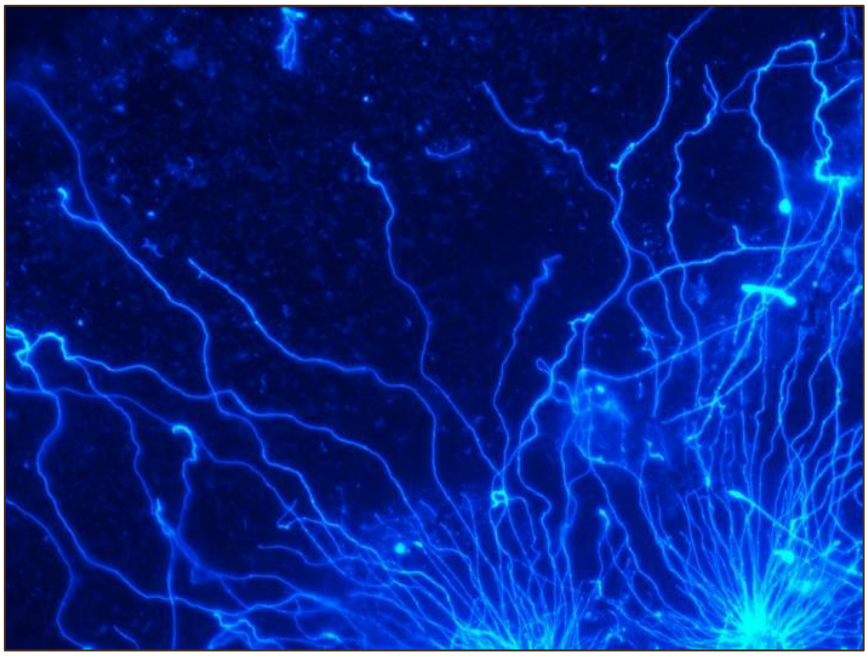

Fig 3.5a. Hongos creciendo en la superficie interior del emisor de goteo. La preparación se tiñó con KOH y blanco de calcoflúor y se observó en un microscopio equipado con luz UV.
Autor: Paweł Trzciński.

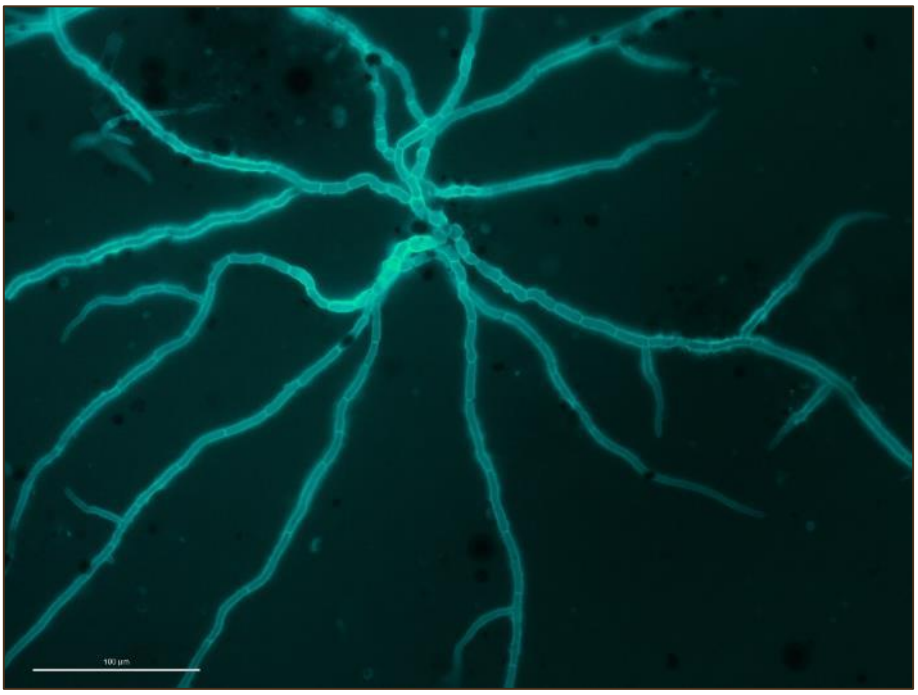

Fig 3.5b. Hongos creciendo en la membrana del emisor de goteo. La preparación se tiñó con KOH y blanco de calcoflúor y se observó en un microscopio equipado con luz UV.
Autor: Paweł Trzciński.

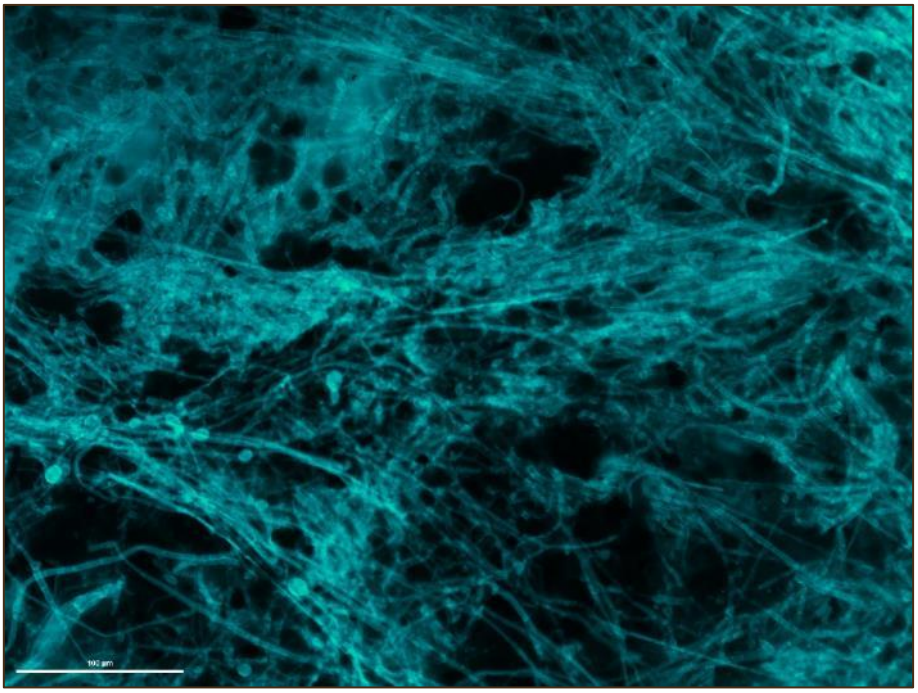

Fig 3.6. Estructura de la biomasa fúngica recogida del emisor de goteo obstruido. La preparación se tiñó con KOH y blanco de calcoflúor y se observó en un microscopio equipado con luz UV.
Autor: Paweł Trzciński.

Referencias

Adesemoye A.O., Torbert H.A., Kloepper J.W. 2009. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Allow Reduced Application Rates of Chemical Fertilizers. Microbial Ecology, 58(4), 921–929.

Alavi P., Starcher M. R., Zachow C., Müller H., Berg G. 2013. Root-microbe systems: the effect and mode of interaction of stress protecting agent (SPA) Stenotrophomonas rhizophila DSM14405T. Frontiers in plant science, 4, 141.

Boari A., Zuccari D., Vurro M. 2008. 'Microbigation': Delivery of biological control agents through drip irrigation systems. Irrigation Science, 26(2), 101–107.

Doruchowski G., Świechowski W., Trzciński P., Sas-Paszt L., Hołownicki R. 2015. Effect of spray application parameters on viability of rhizobacteria used as bio-pesticides in organic fruit production. 448, 60–61.

Glick B.R. 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Scientifica, 2012, 1–15.

Kaminsky L. M., Trexler R. V., Malik R. J., Hockett K. L., Bell, T. H. 2019. The inherent conflicts in developing soil microbial inoculants. Trends in Biotechnology, 37(2), 140-151.

Marthi B., Fieland V. P., Walter M., Seidler R. J. 1990. Survival of bacteria during aerosolization. Applied and Environmental Microbiology, 56(11), 3463–3467.

Souza R.D., Ambrosini, A., Passaglia L.M.P. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. Genetics and Molecular Biology, 38(4), 401–419.

Timmusk S., Abd El-Daim I. A., Copolovici L., Tanilas T., Kännaste A., Behers L., Nevo E., Seisenbaeva G., Stenström E., Niinemets Ü. 2014. Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. PLOS ONE, 9(5), e96086.

Trzcinski P., Sas-Paszt L., Treder W. 2013. Mikrobiologiczne przyczyny zapychania się kroplowników. Hasło Ogrodnicze, 02.

Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud M.L., Touraine B., Moënne-Loccoz Y., Muller D., Legendre L., Wisniewski-Dyé F., Prigent-Combaret C. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. Frontiers in Plant Science, 4, 356.

Vassileva M., Flor-Peregrin E., Malusá E., Vassilev N. 2020. Towards Better Understanding of the Interactions and Efficient Application of Plant Beneficial Prebiotics, Probiotics, Postbiotics and Synbiotics. Frontiers in Plant Science, 11, 1068.

Capítulo 4. Tecnología de producción de productos microbiológicos

Katarzyna Góralska[1], Magdalena Jopek[1], Anna Gierut-Kot[1], Jakub Drewniak[1], Roksana Rakoczy-Lelek[1], Maria Bylica[1], Radosław Wilk[1]

[1]INTERMAG sp. z o.o., Al. 1000-lecia 15G, 32-300 Olkusz, POLONIA

El propósito de este capítulo es presentar el fascinante campo de la tecnología microbiana, que no sólo transforma nuestra forma de ver los microorganismos, sino que también tiene el potencial de tener un impacto revolucionario en nuestra realidad cotidiana. Si comprendemos y avanzamos en este campo, podremos abrir la puerta a descubrimientos, productos innovadores y sostenibilidad a escala mundial.

1. Tipos de formulación (en un contexto práctico: para qué, cuáles utilizamos y por qué).

En el diseño y desarrollo de productos microbiológicos con propiedades beneficiosas para las plantas, los puntos clave para obtener un buen producto final son (Vassileva et al. 2021):

1. Aislamiento y caracterización de una cepa microbiana eficaz;
2. Desarrollo de un proceso de fermentación eficaz para la producción de biomasa y/o esporas;
3. Un procedimiento de formulación eficaz

El aspecto menos estudiado pero con un impacto decisivo es la selección de la técnica de formulación adecuada para asegurar la mayor eficacia y estabilidad del producto en los sistemas suelo-planta. Entre las formulaciones disponibles en el mercado predominan los productos líquidos y sólidos (Ibáñez et al., 2023). La elección del procedimiento de formulación está interrelacionada con el modo de fermentación; es el proceso tecnológico, que finalmente produce la biomasa/esporas, el que debe ser formulado. Por ejemplo, algunas empresas producen productos con esporas de biocontrol basados en la fermentación en estado sólido, mientras que otras prefieren productos con células líquidas basados en la fermentación líquida sumergida.

Las formulaciones líquidas se basan en soluciones acuosas, soluciones oleosas o emulsiones de aceite en agua, con un uso menos frecuente de polímeros. Los microorganismos en soluciones líquidas suelen requerir aditivos como soluciones nutritivas que contengan nutrientes básicos o sustancias que estabilicen toda la formulación (Chaudhary et al. 2020). Por el contrario, en el caso de los productos de flujo libre, deben utilizarse materiales portadores que favorezcan la persistencia de los microorganismos. Estos materiales deben ser neutros desde el punto de vista medioambiental y caracterizarse por una estructura porosa específica que retenga células y esporas. Materiales como la turba, el talco, el lignito, la caolinita y la zeolita son soportes de uso común. En INTERMAG se utilizan bacterias para formar formulaciones a granel, que se obtienen secando biomasa a bajas temperaturas y presión (liofilización). Cabe mencionar que los portadores utilizados en las formulaciones a granel aumentan la tasa de supervivencia de las bacterias, protegiéndolas de los cambios en el contenido de humedad y aumentando el volumen del producto, lo que resulta en una dispersión uniforme de los microorganismos durante la aplicación (Singleton et al. 2022), aumentando así su desarrollo y eficacia en los sistemas suelo-planta.

Las formulaciones líquidas y de flujo libre tienen características propias que deben tenerse en cuenta a la hora de elaborar un producto microbiano. Lo que no se discute en los trabajos científicos es que la forma líquida de los productos permite una preparación más accesible y rápida del líquido de trabajo para su

aplicación. Además, no requiere la preparación previa de una papilla, como en el caso de las fórmulas de flujo libre. Otra ventaja importante es que las formulaciones líquidas presentan una mejor miscibilidad con otros productos fitosanitarios, lo que reduce el riesgo de obstrucción de las boquillas durante la pulverización. Desde un punto de vista práctico, el menor riesgo de obstrucción de las boquillas y la capacidad de mezclarse con otras formulaciones aumentan la flexibilidad y la eficacia de la aplicación.

Cabe señalar que las formulaciones líquidas pueden ser más susceptibles a las condiciones de almacenamiento que pueden afectar a la degradación u oxidación de los componentes de la formulación. Los envases tienden a ser más grandes y la concentración de microorganismos en solución es menor que la de las formulaciones a granel. La elevada concentración de microorganismos en los productos de flujo libre permite utilizar envases más pequeños, lo que los hace más ligeros y fáciles de transportar y almacenar. Sin embargo, la aplicación de estos productos es potencialmente más difícil. La necesidad de dispersar uniformemente el polvo en el líquido de trabajo y el riesgo de precipitación de fracciones insolubles durante la aplicación implican una mayor implicación a la hora de preparar la solución. Cabe mencionar que las formulaciones de flujo libre muestran una mayor estabilidad durante un periodo de almacenamiento más prolongado, lo que proporciona una vida útil más larga.

Todos los tipos de formulaciones que contengan microorganismos destinados a la comercialización deben someterse a pruebas de estabilidad en el tiempo, la temperatura y la compatibilidad con otros productos agroquímicos cuando se recomiende su uso combinado. Desde el punto de vista industrial, la introducción de varios tipos diferentes de productos agroquímicos en una única mezcla de depósito que no haya sido sometida previamente a pruebas de uso combinado puede dar lugar a interacciones adversas entre los microorganismos y los ingredientes activos contenidos en los distintos tipos de formulaciones, lo que puede provocar una pérdida de eficacia biológica de dicha mezcla de depósito. La mezcla de depósito preparada para la prueba con la formulación microbiana sometida a prueba también debe ser estable durante al menos 4 horas. En las pruebas de mezclabilidad, la abundancia y la supervivencia de los microorganismos se determinan a intervalos.

En nuestro trabajo, a la hora de desarrollar un nuevo producto, intentamos establecer un riguroso control de calidad en lo que respecta a la formulación y las pruebas de eficacia en una determinada especie de cultivo, así como el impacto medioambiental y la posible fitotoxicidad de dosis superiores a las normales. En consecuencia, nuestra intención es desarrollar nuevos productos formulados, que deberían ser estables y aptos tras su almacenamiento durante al menos 12 meses.

2. Tecnología de fabricación de productos microbianos

En el dinámico mundo actual, la tecnología de fabricación de productos microbianos es una industria fascinante que está revolucionando muchos campos, desde la agricultura y la medicina hasta la protección del medio ambiente. Los microorganismos, como bacterias y hongos, se están convirtiendo en objeto de intensa investigación y fuente de soluciones innovadoras y productos modernos.

La tecnología microbiana se basa en el uso de microorganismos para producir diversas sustancias, desde enzimas y antibióticos hasta preparados agrícolas especializados (Kuila y Sharma 2018). Existe una estrecha interacción entre la ciencia biológica, la química, la ingeniería de procesos y los aspectos prácticos de la producción industrial. Los microorganismos desempeñan un papel clave en esta tecnología, actuando como

fábricas biológicas capaces de sintetizar diversos compuestos químicos. Los microorganismos se adaptan para producir las sustancias deseadas mediante fermentación o modificación genética, lo que introduce nuevas posibilidades de producción industrial y agrícola. La tecnología de producción de productos microbianos es aplicable en una amplia gama de campos. En agricultura, los microorganismos producen metabolitos que mejoran el rendimiento de los cultivos, la resistencia de las plantas y la estructura del suelo. En medicina, son una fuente de antibióticos y fármacos biotecnológicos. En la industria alimentaria, producen productos fermentados. En la protección del medio ambiente, se utilizan para tratar las aguas residuales y el suelo.

A pesar de sus muchas ventajas, la tecnología también presenta retos. Introducir soluciones innovadoras, gestionar procesos complejos y mantener prácticas sostenibles son algunas de las cuestiones que requieren nuestra atención. El desarrollo de técnicas modernas de ingeniería genética microbiana abre simultáneamente nuevas perspectivas y plantea cuestiones éticas y normativas.

2.1. Selección y aislamiento de microorganismos

Los microbios han colonizado entornos en los que hay posibilidades de que sobrevivan, lo que crea una amplia gama de lugares, desde aquellos en los que se dan las condiciones óptimas para la mayoría de las bacterias hasta otros extremos en los que viven bacterias muy especializadas. Los microorganismos desempeñan un enorme papel en el medio ambiente. Son responsables de la circulación de elementos biogénicos en la biosfera (carbono, nitrógeno y fósforo) y de la distribución de una gran parte de los elementos biogénicos en los organismos vivos. El nitrógeno molecular es un componente importante del aire, pero inaccesible para los organismos superiores. Gracias a la actividad de los microorganismos, se convierte en compuestos disponibles para las plantas. El número de especies bacterianas en un gramo de suelo varía de varios cientos a más de once mil (Elander y Chang 1979). La composición cuantitativa y cualitativa de la comunidad bacteriana depende de varios factores fisicoquímicos, así como del tipo de suelo y de las especies vegetales que lo habitan, de las prácticas agrícolas, de la zona geográfica, del contenido de nutrientes, de la salinidad y de la contaminación ambiental. Afectan a la meteorización de los minerales, contribuyendo así a los cambios en los procesos de formación del suelo (Bednarski y Fiedurek 2012). Además, descomponen y mineralizan la materia orgánica. Al renovar los compuestos húmicos, dan forma y mejoran la estructura del suelo. Evitan la erosión y protegen el suelo de la desecación. Facilitan la limpieza del suelo al participar en la descomposición de pesticidas, hidrocarburos y antibióticos.

La selección de microorganismos para productos agrícolas como fertilizantes, bioestimulantes y productos fitosanitarios es un proceso cuyo objetivo es seleccionar cepas de microorganismos con propiedades beneficiosas. El primer paso consiste en definir los objetivos que debe cumplir el microorganismo. Estos pueden incluir, por ejemplo, la capacidad de fijar nitrógeno, producir sustancias que promuevan el crecimiento de las plantas o la capacidad de suprimir patógenos.

Las etapas utilizadas para seleccionar los microorganismos beneficiosos son las siguientes:

- Selección primaria y aislamiento de un cultivo puro,
- Selección secundaria.

El aislamiento primario de microorganismos de entornos específicos implica la selección de microorganismos que presenten las propiedades deseadas. Tras el aislamiento de los microorganismos se procede a su

caracterización exhaustiva. Se estudian sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Esto permite determinar si los microorganismos presentan las características deseadas. En la selección secundaria participan los aislados con la mayor expresión del rasgo elegido (Steele y Stowers 1991).

Fig. 4.1. Colonias de aislados bacterianos cultivados en agar tripticasa de soja (TSA), medio que confirma la diversidad microbiana durante el aislamiento y la selección de microorganismos beneficiosos para las plantas.
Fuente: Intermag sp. z o.o.

Las pruebas de cribado de actividad específica desempeñan un papel fundamental en la selección de microorganismos específicos. Las pruebas de laboratorio para confirmar las propiedades de los microorganismos incluyen una variedad de métodos y técnicas que permiten un análisis exhaustivo de su morfología, fisiología, genética y otros rasgos característicos.

Fig. 4.2. Ejemplo de aislamiento selectivo de microorganismos del género Bacillus *en medios sólidos. Izquierda: medio cromogénico para la diferenciación de microorganismos acidificantes. Derecha: medio de agar con sal de manitol para la diversificación de la fuente de carbohidratos de las bacterias grampositivas.*
Fuente: Intermag sp. z o.o.

La técnica básica de selección es el método de enriquecimiento del medio. Se trata del proceso de proporcionar un medio adecuado que sea apto para el crecimiento de microorganismos específicos y, al mismo tiempo, inhibidor o letal para los que no lo son. Por ejemplo, los microorganismos anaerobios no sobreviven en presencia de oxígeno. La resistencia a metales pesados, antibióticos, oxidantes y disolventes orgánicos también puede aplicarse a entornos selectivos para microorganismos con propiedades específicas.

Los avances significativos en el desarrollo de herramientas analíticas afectan significativamente a la capacidad de cribado de compuestos específicos. El análisis instrumental es útil tanto en el cribado

secundario como en el primario cuando no se dispone de técnicas más sencillas. Instrumentos como la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), la cromatografía de gases (CG), la espectrometría de masas (EM), la espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN) y otros permiten una detección más rápida, selectiva y altamente sensible de los productos metabólicos. Cada vez es más importante el uso de herramientas de biología molecular y bioinformática para verificar rápidamente el potencial genético de los microorganismos. El conjunto específico de pruebas depende del tipo de microorganismo y de la finalidad del estudio (Olicón-Hernández et al. 2022).

Los microorganismos que resultan prometedores en condiciones de laboratorio se prueban en condiciones de campo. Esto permite evaluar su eficacia en condiciones agrícolas realistas. Los mejores microorganismos se seleccionan para su posterior cultivo en función de los resultados de las pruebas. Este proceso implica la selección de genotipos con características deseables y su reproducción masiva en condiciones controladas.

2.2. Almacenamiento

Una vez identificado y caracterizado el microorganismo, debe almacenarse en unas condiciones que garanticen su estabilidad fisiológica, biotecnológica y genética. Este proceso incluye el mantenimiento de las cepas seleccionadas aisladas para posteriores experimentos y su caracterización.

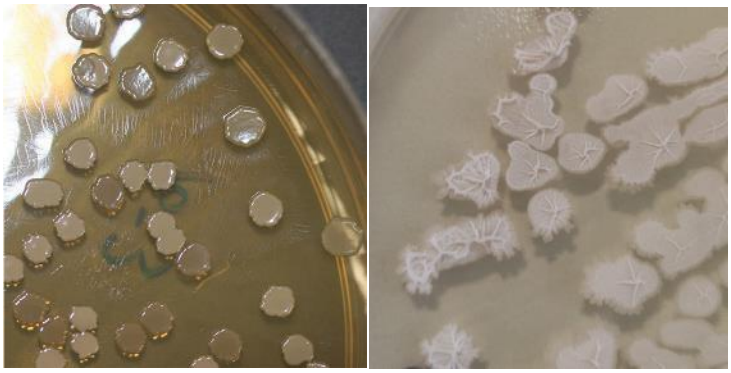

Fig. 4.3. Cultivos bacterianos puros aislados del ambiente. Izquierda: Bacillus pumilus*. Derecha:* Bacillus subtilis*.*
Fuente: Intermag sp. z o.o.

Los microorganismos aislados seleccionados se almacenan en nuestros propios recursos y/o en instituciones externas para formar colecciones (bancos). Los bancos de microorganismos son una herramienta importante para la ciencia, la medicina, la industria y la agricultura. Las nuevas especies o cepas con características previamente desconocidas descritas en publicaciones científicas deben estar a disposición de todas las partes interesadas. Por razones de seguridad, los microorganismos aislados deben almacenarse por medio de varios medios alternativos. Los microorganismos se almacenan en la colección en estado liofilizado, ultracongelados a -80°C en nitrógeno líquido a temperaturas de hasta -195°C, o en recipientes especiales con un conservante (Stackebrandt et al. 2014).

Fig. 4.4. Sistemas de contenedores para el almacenamiento de microorganismos a bajas temperaturas

Cada cultivo se documenta cuidadosamente con información sobre la especie, la cepa, las condiciones de cultivo, las características fisiológicas y otros datos importantes. Los bancos microbianos desempeñan un papel crucial en la conservación de los recursos biológicos, contribuyen al progreso científico y tecnológico y garantizan la continuidad y reproducibilidad de la producción de preparados a base de microorganismos activos.

2.3. Inóculo

Un inóculo microbiano es un término que describe un cultivo microbiano realizado en condiciones específicas que se utiliza para iniciar un proceso de cultivo a gran escala. En el contexto de la tecnología de formulación microbiana para la agricultura, el inóculo desempeña un papel clave como fuente de microorganismos que, tras un proceso de fermentación, se introducirán en formulaciones que afectan al suelo y a las plantas. Sirve como punto de partida, proporcionando el número necesario de microorganismos activos y sanos para influir positivamente en el entorno agrotécnico. El proceso de producción de inóculo microbiano es un paso cuidadosamente controlado. Comienza con la recogida de una cepa activa de microorganismos, que luego se cultiva a menor escala para formar un inóculo. En este proceso, se procura garantizar las condiciones de cultivo adecuadas, como la composición del medio, la temperatura y la humedad, para asegurar la capacidad de los microorganismos de multiplicarse eficazmente. La calidad del inóculo es un factor clave para la eficacia de los preparados microbianos. Los microorganismos del inóculo deben ser activos, capaces de competir con los patógenos del suelo, mejorar la disponibilidad de nutrientes y promover un crecimiento sano de las plantas. Los productores se ocupan de controlar los parámetros de cultivo mediante la supervisión de la calidad microbiológica y genética. La eficacia del inóculo microbiano en la agricultura depende principalmente de su capacidad de adaptación a las condiciones del suelo. Los productores deben adaptar el proceso de cultivo de los microorganismos para que se habitúen a las condiciones ambientales específicas en las que se aplicarán. Esta adaptación permite a los microorganismos colonizar mejor el suelo y afectar positivamente a las plantas.

Una vez conseguido el inóculo óptimo a pequeña escala, el proceso se amplía para producir cantidades mayores. Los biorreactores y fermentadores cultivan microorganismos en condiciones controladas para producir grandes cantidades de microorganismos activos listos para su uso en formulaciones agrícolas.

La eficacia final de los preparados microbianos en la agricultura está directamente relacionada con la calidad del inóculo. Un inóculo correctamente preparado garantiza el suministro de un número adecuado de

microorganismos activos al campo, lo que se traduce en un aumento de la bioestimulación de las plantas, una reducción de los patógenos del suelo y una mejora de la salud general del suelo. La supervisión del proceso de producción del inóculo y de su composición microbiana es clave para mantener altos niveles de calidad y eficacia en la tecnología de producción de preparados microbianos para la agricultura.

2.4. Medios de cultivo

Los medios de cultivo son un elemento básico en la tecnología de los preparados microbianos para la agricultura. Son nutrientes especialmente compuestos diseñados para proporcionar a los microorganismos los ingredientes adecuados para su crecimiento y activación. Un medio de cultivo es una combinación sólida, líquida o semisólida de sustancias diseñadas para favorecer el crecimiento de microorganismos. En la producción de formulaciones microbianas, un medio de cultivo adecuadamente seleccionado es crucial para la calidad y productividad de los microorganismos introducidos en el medio agrícola. La composición de los medios microbianos se adapta a los requisitos de cada microorganismo que se cultiva. Suelen contener fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, macro y micronutrientes y otros nutrientes. Dependiendo del tipo de microorganismos, las soluciones nutritivas pueden ajustarse para maximizar su crecimiento y actividad. La composición óptima de la solución es crucial para obtener grandes cantidades de cultivos microbianos activos. En algunos casos, podría resultar económicamente atractivo utilizar residuos agroindustriales como medio de producción (Vassilev et al. 1998).

Fig. 4.5. Medios microbiológicos utilizados habitualmente en el laboratorio.
Fuente: Intermag sp. z o.o.

Los medios microbiológicos desempeñan un papel fundamental en el proceso de cultivo de microorganismos a gran escala. Los fabricantes de preparados microbiológicos adaptan cuidadosamente los medios a las características específicas de las cepas cultivadas, lo que permite un crecimiento rápido y sano de los microorganismos. Proporcionan nutrientes, estabilidad y uniformidad de las condiciones de cultivo, lo que es importante para obtener preparados eficaces. La composición de los medios de cultivo influye en las características de los microorganismos cultivados en la producción de preparados microbiológicos. Unos medios de cultivo bien ajustados pueden afectar a la producción de metabolitos, la actividad enzimática o la capacidad de competir con patógenos. Un control cuidadoso de la composición de las soluciones nutritivas permite adaptar la producción de microorganismos a aplicaciones agrícolas específicas, aumentando la eficacia de las formulaciones.

La producción de medios microbianos implica una mezcla cuidadosa y un suministro controlado de nutrientes. Durante esta etapa, los fabricantes deben tener cuidado de mantener las proporciones adecuadas de ingredientes para satisfacer las necesidades de los microorganismos que se cultivan. El control de

parámetros como el pH, la temperatura y la concentración de nutrientes es crucial para lograr unas condiciones de cultivo óptimas.

La calidad final de los preparados microbianos en agricultura está estrechamente relacionada con la calidad de los medios microbianos utilizados. La composición eficaz del medio afecta positivamente a la reproducción, actividad y viabilidad de los microorganismos, lo que se traduce en la eficacia de la formulación. Los fabricantes controlan con precisión este elemento del proceso, asegurándose de que el medio favorezca las características esperadas de los microorganismos y garantice la consistencia del producto final. Para obtener resultados óptimos en este ámbito, es fundamental adaptar con precisión los medios a las necesidades de los microorganismos cultivados.

2.5. Componentes clave de la línea de producción

El elemento clave de cualquier planta de biotecnología es el biorreactor, en torno al cual se construye toda la planta para producir el producto final. En función de las necesidades, puede incluir mezcladores, centrifugadoras, sistemas de filtración, secadores, liofilizadores, clarificadores y decantadores.

La mayoría de los procesos biotecnológicos que utilizan microorganismos buscan trasladarlos de su hábitat natural a través de una placa de Petri a biorreactores, también conocidos como fermentadores. Los biorreactores y sus procesos suelen ser la pieza central de cualquier biotecnología. Es en ellos donde se produce el crecimiento del microorganismo y la producción o transformación del producto deseado. En términos estrictamente técnicos, un biorreactor se considera: "Un espacio cerrado de cualquier tamaño y forma en el que existe la posibilidad de intercambiar momento, calor y masa con el medio ambiente y la posibilidad de una reacción química. El biorreactor debe contener cualquier biocatalizador al que se le crean tales condiciones de operación para obtener el efecto deseado en forma de un curso predeterminado de una reacción bioquímica o crecimiento de células de un organismo vivo." (Olicón-Hernández et al. 2022).

Como se ha indicado anteriormente, la definición de biorreactor es muy general, por lo que los biorreactores son objeto de numerosas clasificaciones basadas en diferentes elementos de estructura, modos de funcionamiento o biocatalizadores. La división más general se refiere a su diferenciación en términos de cómo se lleva a cabo el proceso:

- Biorreactores para cultivo sumergido
- Biorreactores para cultivo en medios sólidos
- Biorreactores para cultivo con un biocatalizador inmovilizado

El tipo de biorreactor utilizado para el proceso depende principalmente de los requisitos de crecimiento del microorganismo. Los fermentadores más utilizados son los destinados a procesos aeróbicos sumergidos. En este tipo de fermentador, el medio se encuentra en estado líquido y el biocatalizador está suspendido en él.

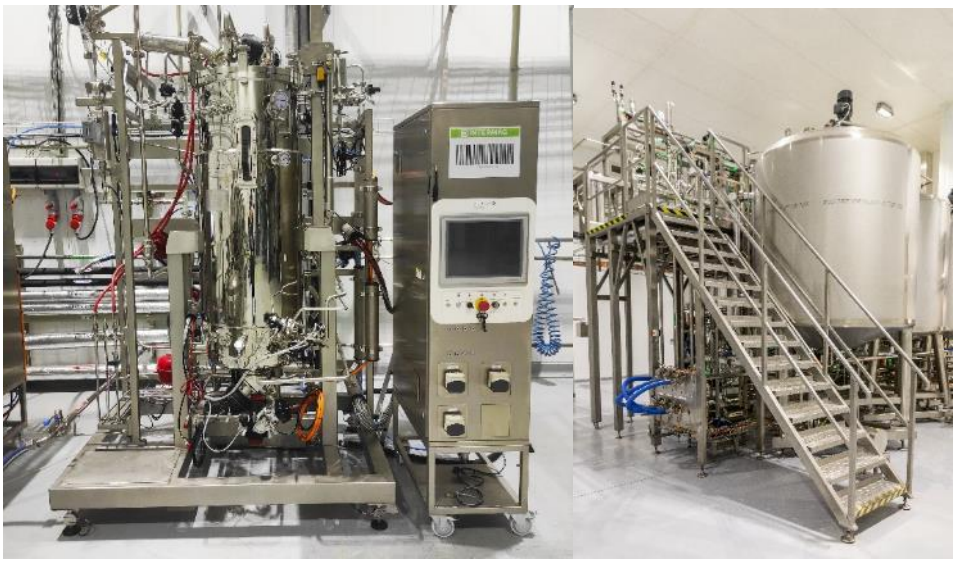

Fig. 4.6. Biorreactores para la producción de productos microbianos en INTERMAG.
Fuente: Intermag sp. z o.o.

Como se ha indicado anteriormente, el biorreactor es un punto esencial de la mayoría de los procesos de producción biotecnológica, y cada uno de los componentes posteriores se selecciona en función del funcionamiento de un determinado biorreactor o de sus conjuntos. Una planta de este tipo puede incluir mezcladores para combinar la biomasa con los componentes de la formulación, membranas de filtración o centrifugadoras capaces de separar la biomasa del fluido de cultivo, secadores o liofilizadores para obtener un producto a granel, homogeneizadores para liberar el bioproducto del interior de las células, y muchas otras piezas de equipo a menudo desarrolladas y construidas específicamente para producir un producto concreto.

Fig. 4.7. Línea de producción de productos microbianos en INTERMAG.
Fuente: Intermag sp. z o.o.

2.6. Tecnología de producción de biopreparados

Un biopreparado puede ser: un microorganismo en diversas formas, un metabolito, un medio de postdigestión o una mezcla de los tres. Teóricamente, lo más fácil de obtener es una mezcla postdigestión que contenga tanto el microorganismo como el medio postdigestión con todos los metabolitos. Dicha

producción se basa en la multiplicación del microorganismo en cultivo discontinuo, es decir, preparación del medio, inoculación, cultivo y recogida de la biomasa producida. En la práctica, surgen aquí varios problemas relacionados con la viabilidad del microorganismo en el producto acabado, la estabilidad de los metabolitos secundarios que constituyen las propiedades del producto, el almacenamiento de la propia biomasa así como del producto y, sobre todo, el envasado adecuado para eliminar el riesgo de contaminación con microflora indeseable, para la que la propia biomasa puede servir de medio.

Para preservar las propiedades del bioproducto durante el mayor tiempo posible, se utiliza una temperatura de almacenamiento reducida, que funciona bien para productos basados en bacterias como *Rhizobium* spp. o *Azotobacter* spp. Los productos que contienen bacterias formadoras de esporas, por ejemplo, *Bacillus* spp., se caracterizan por una mayor vida útil precisamente por la estabilidad de las formas de esporas.

Las formulaciones sólidas requieren un procesamiento posterior de la biomasa postcultivo, es decir, una compactación adecuada y la adición de sustancias protectoras y portadoras. Los métodos más comunes para obtener formulaciones secas son la pulverización y la liofilización. Ambos procesos tienen como objetivo eliminar el agua de la biomasa, pero lo hacen de forma diferente.

La liofilización, también conocida como secado por sublimación, es un proceso que tiene lugar a bajas temperaturas y en condiciones de vacío. La preparación del microorganismo para el proceso de liofilización implica concentrar la biomasa tanto como sea posible, es decir, eliminar el agua inicialmente por filtración o centrifugación. A continuación, la biomasa concentrada se mezcla con un crioprotector, que es una sustancia que se supone que protege las células del microorganismo de la rotura por cristales de hielo durante la primera etapa de liofilización, es decir, la congelación a temperaturas tan bajas como -80°C. Entre los agentes protectores más conocidos se encuentran la maltodextrina, la sacarosa, la leche desnatada en polvo, la trehalosa y el glicerol. La mayor ventaja de la liofilización es la alta concentración del producto, que elimina casi por completo el agua y prolonga su vida útil. Sin embargo, es un proceso costoso, lo que en última instancia se traduce en un precio más elevado del producto comercial.

Fig. 4.8. Liofilizador en la línea de producción de INTERMAG.
Fuente: Intermag sp. z o.o.

El secado por atomización es un proceso a alta temperatura en el que la biomasa se pulveriza en aire caliente. La preparación de la biomasa, al igual que en la liofilización, consiste en compactarla para obtener la mayor cantidad posible de materia seca, que producirá los granos adecuados del producto acabado en el secador. El secado por pulverización se utiliza con microorganismos expuestos a altas temperaturas (principalmente bacterias formadoras de esporas, por ejemplo, *Bacillus* spp.) o se utilizarán sustancias estabilizadoras apropiadas, por ejemplo, proteína de suero, maltodextrina, almidón o polisacáridos.

Para los productos basados en un metabolito específico, como los factores de nodulación o las enzimas específicas, el cultivo de microorganismos debe realizarse en condiciones que dirijan el metabolismo del microbio para la producción. Esto puede lograrse alterando las condiciones físicas del cultivo o la composición adecuada del medio de cultivo.

2.7. Seguimiento y control de las variables que afectan al crecimiento microbiano y al control de calidad

La supervisión del cultivo de microorganismos es un proceso clave en los laboratorios, la industria biotecnológica, la producción farmacéutica y la investigación científica. Esto incluye el control de las condiciones de cultivo, la evaluación del crecimiento microbiano, el seguimiento de la producción de metabolitos y el mantenimiento de la pureza y la calidad del cultivo. La supervisión de los cultivos microbianos es esencial en la investigación y la industria para garantizar el control de los procesos, optimizar el rendimiento y producir resultados coherentes. En el campo de la biotecnología industrial, el cultivo microbiano es un paso fundamental en la producción de diversas sustancias, desde fármacos hasta productos agrícolas. Para garantizar unas condiciones de crecimiento óptimas, es necesario controlar de cerca las variables que afectan a los microorganismos. Este proceso implica controlar los parámetros ambientales, la densidad del cultivo, la producción de metabolitos y la pureza del cultivo.

Un gráfico bien conocido del crecimiento de microorganismos durante el cultivo estacionario se conoce como cultivo por lotes. La curva de crecimiento de un microorganismo, al igual que la producción de un producto biotecnológico, tiene cuatro etapas características:

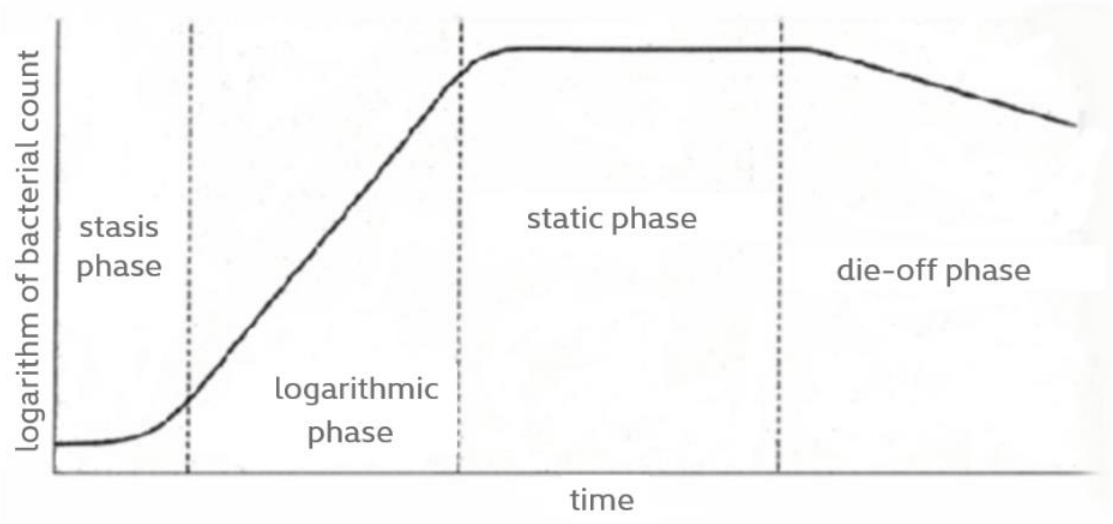

Fig. 4.9. Curva de crecimiento del cultivo por lotes.

Fuente: Schlegel 2004

1. La fase de latencia o de adaptación es el periodo en el que el microorganismo se adapta al nuevo medio de cultivo y comienza su crecimiento;
2. La fase logarítmica o de crecimiento exponencial depende de la disponibilidad de nutrientes y de la acumulación de metabolitos que limitan el crecimiento del cultivo, como en el caso de la fermentación alcohólica;
3. La fase estacionaria, también conocida como fase de latencia, en la que el número de divisiones celulares es igual al número de células moribundas;
4. La fase de muerte comienza cuando las células empiezan a morir rápidamente.

Este gráfico es importante para controlar el proceso de producción, ya que es necesario situar correctamente los momentos relevantes del proceso de producción en la curva anterior. Un control hábil del proceso basado en el conocimiento del estado del cultivo y de los requisitos del microorganismo en las distintas fases de crecimiento permite un control eficaz del proceso y una elevada eficiencia de la producción. El control del proceso y los cultivos están influidos por factores físicos y químicos como la temperatura, el pH y las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono.

La temperatura tiene un efecto decisivo sobre la actividad enzimática y el metabolismo microbiano. El control de la temperatura en los cultivos de biorreactores se lleva a cabo calentando y enfriando la camisa de agua del biorreactor (utilizada con mayor frecuencia en los grandes fermentadores industriales) o los intercambiadores de calor situados en el recipiente de cultivo (populares en los pequeños reactores de laboratorio). El control de la temperatura en los biorreactores es multietapa e incluye el control de la temperatura del recipiente de cultivo, la temperatura de la camisa de calentamiento o del intercambiador de calor y el medio de calentamiento y enfriamiento.

Un pH adecuado es esencial para la correcta estructura de las proteínas y la función de las enzimas. Cada microorganismo tiene un rango específico de tolerancia del pH de la solución en la que puede sobrevivir y un estrecho rango óptimo específico que le permite crecer de la forma más eficiente. El pH se controla en función de las lecturas de los electrodos de pH colocados en el biorreactor.

Unos niveles adecuados de oxígeno son cruciales para los microorganismos aerobios, mientras que los anaerobios requieren un entorno pobre en oxígeno. La distribución del gas es la cuestión más crítica cuando se cultivan microorganismos aerobios como *Bacillus* spp. La forma del reactor, el agitador utilizado y su potencia, la forma del dispositivo de aireación y su ubicación en el recipiente de cultivo son factores importantes en la distribución del gas. El control de la saturación relativa del medio con oxígeno se realiza mediante electrodos de oxígeno. En el caso de organismos anaerobios, el oxígeno debe eliminarse del medio saturándolo con un gas inerte, como el nitrógeno, ya que para muchos organismos es perjudicial, como las bacterias metanogénicas. En los biorreactores con agitador mecánico, mantener las condiciones deseadas de oxigenación del cultivo implica intensificar la agitación durante la fase de mayor demanda de oxígeno, lo que puede dar lugar a elevadas fuerzas de cizallamiento dentro del agitador.

Además de las variables fisicoquímicas del biorreactor, es muy importante controlar el crecimiento del microorganismo y la calidad del medio durante el cultivo. Dependiendo del producto objetivo, se realizan mediciones de la utilización por parte del microorganismo de los componentes del sustrato, por ejemplo, la glucosa, utilizando pruebas en tira, o en sistemas más avanzados que utilizan espectroscopia de infrarrojo

cercano, el crecimiento de un metabolito a lo largo del tiempo, por ejemplo, la producción de antibióticos por *Streptomyces*. Por otra parte, se puede controlar el crecimiento de los microagregados *per se* mediante el recuento de bacterias *in situ* utilizando sondas de densidad óptica OD 600 o soluciones más sofisticadas que realizan mediciones citométricas y de capacidad eléctrica del cultivo, que se correlaciona con el número de células viables en solución.

2.8. Consideraciones higiénicas para toda la línea

En una configuración ideal, toda la producción biotecnológica debería tener lugar en condiciones estériles, desde la inoculación del primer matraz hasta la confección del producto acabado. Garantizar la esterilidad de los cultivos es el proceso clave y que requiere más recursos en microbiología industrial, ya que comienza en la fase de diseño de las instalaciones y las líneas de producción y de los productos objetivo. La norma de calidad básica que define las líneas de producción en biotecnología son los requisitos establecidos por la FDA estadounidense (Food and Drug Administration) y 3A, que especifican varios requisitos, como que las superficies que entren en contacto con el producto tengan soldaduras electropulidas y perfectamente lisas. Este procedimiento se traduce en una mayor utilización de la instalación, ya que una rugosidad fina puede atrapar biopelículas, lo que provoca la porosidad del material contaminante, que puede impedir la desgasificación del recipiente durante la esterilización, lo que conduce a la no esterilidad del biorreactor u otro recipiente. El siguiente paso consiste en seleccionar materiales adecuados para la producción prevista, es decir, resistentes a las altas temperaturas durante la esterilización por vapor y a los productos químicos de limpieza agresivos durante los procesos de limpieza y desinfección.

3. Eficacia biológica y comercialización

3.1. Verificación de la eficacia biológica en condiciones de laboratorio

La verificación de la eficacia biológica de las formulaciones microbianas es un paso clave en el proceso de su desarrollo y evaluación. Implica una serie de pruebas de laboratorio para confirmar si los microorganismos de las formulaciones presentan la actividad biológica y fisicoquímica esperada. En este contexto, la eficacia puede incluir la capacidad de solubilizar fósforo, asimilar nitrógeno, controlar patógenos, mejorar la salud de las plantas o afectar a la estructura microbiana del suelo.

Para evaluar la eficacia biológica de los preparados microbianos se utilizan diversos métodos de laboratorio. Puede tratarse de ensayos *in vitro*, análisis microscópicos, técnicas de biología molecular o estudios sobre la producción de metabolitos por parte de los microorganismos. Se utilizan procedimientos específicos en función de la finalidad y el tipo de preparado para obtener una imagen completa de la eficacia biológica. Una prueba comúnmente utilizada es el análisis antagonista, que comprueba la capacidad de los microorganismos de una formulación para competir con los patógenos. Por ejemplo, las pruebas antimicrobianas pueden mostrar si una formulación microbiana inhibe el crecimiento y desarrollo de microorganismos patógenos, lo que constituye un importante indicador de eficacia.

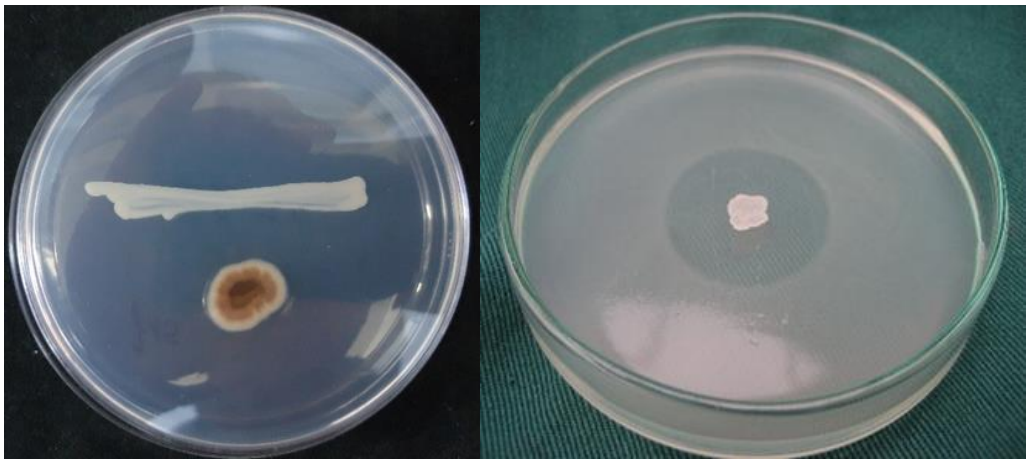

Fig. 4.10. Un ejemplo de verificación de las propiedades de los microorganismos en términos de actividad de biocontrol. Izquierda: Bacillus amyloliquefaciens *frente a* Botrytis cinerea*. Derecha: solubilización de silicio de* Paenibacillus polymyx*a.*
Fuente: Intermag sp. z o.o.

Otra prueba de las propiedades de los microorganismos es su capacidad para solubilizar elementos nutritivos como el fósforo o asimilar el nitrógeno.

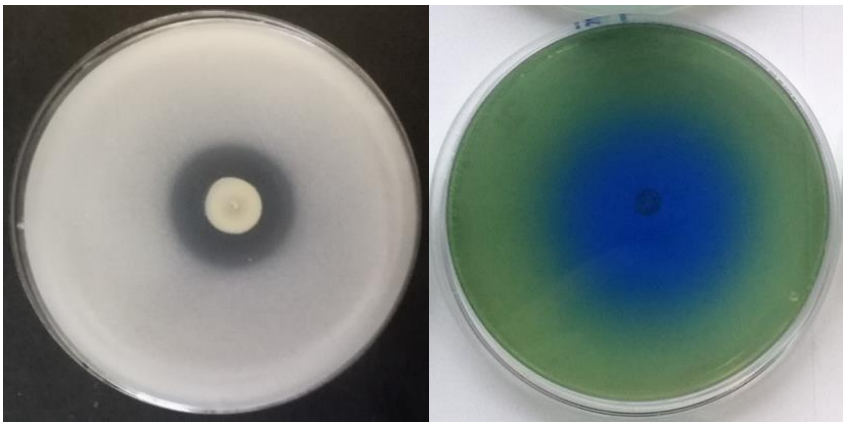

Fig. 4.11. Prueba de propiedades. Izquierda: solubilización de fósforo por Bacillus pumilus *- la decoloración alrededor de los microorganismos indica que el proceso se está produciendo correctamente. Derecha: fijación de nitrógeno por* Paenibacillus polymyxa *- la aparición de azul alrededor de la colonia bacteriana indica una fijación activa de nitrógeno.*
Fuente: Intermag sp. z o.o.

Los análisis genéticos y moleculares permiten identificar microorganismos en preparados y supervisar su actividad biológica; el análisis preciso de las cantidades de expresión génica de ADN o ARN puede proporcionar información sobre la respuesta de los microorganismos a las condiciones de laboratorio, lo que ayuda a evaluar su rendimiento. El seguimiento del crecimiento y la actividad de los microorganismos en los preparados microbiológicos es crucial para evaluar su capacidad de colonización y reproducción en condiciones específicas. La medición de parámetros como el número de células, la cantidad de sustancias químicas secretadas o la tasa de división celular proporciona información importante sobre la eficacia biológica (Sana et al. 2023).

La verificación final de la eficacia biológica de las formulaciones microbianas implica pruebas realizadas en condiciones que simulan los entornos naturales, como el suelo o el agua. De este modo se verifica que los

microorganismos también conservan las propiedades deseadas en condiciones más complejas, lo que resulta crucial para evaluar su idoneidad en condiciones agrícolas reales.

3.2. Verificación de la eficacia biológica en condiciones controladas

La verificación de la eficacia biológica en condiciones controladas es el proceso de evaluación de la eficacia de una cepa o formulación en condiciones controladas, como por ejemplo, en fitotrones o invernaderos. El objetivo de este proceso es comprender el rendimiento de una sustancia o producto sometido a prueba en un contexto biológico, es decir, su efecto sobre el crecimiento y el desarrollo de las plantas.

Las etapas de verificación de la eficacia biológica (en cultivo de plantas) en condiciones controladas son:

1. Diseño del experimento: definición del objetivo del experimento y su metodología, definición de los resultados esperados y selección de los parámetros adecuados.
2. Preparación de un espacio controlado: creación de un entorno experimental en el que puedan controlarse factores como la temperatura, la humedad y la iluminación para garantizar la reproducibilidad y la comparabilidad de los resultados.
3. Aplicación de la sustancia o el producto: aplicación de la sustancia o el producto según las instrucciones.
4. Controlar los parámetros biológicos durante el crecimiento: estudiar parámetros biológicos como la altura de la planta, el contenido de clorofila, el contenido de macro y micronutrientes, etc.
5. Determinación de los parámetros biológicos tras la finalización del cultivo: estudio de los parámetros biométricos de las plantas, es decir, el peso vegetativo.
6. Análisis estadístico de los datos: tratamiento y análisis de los datos recogidos, comparación de los resultados del experimento con el grupo de control e interpretación de los resultados obtenidos.

La verificación de la eficacia biológica es un paso clave en la investigación científica, especialmente en campos como la agricultura, la biología, la biotecnología y la medicina. Permite a científicos, investigadores y empresas de formulación agrícola evaluar si un nuevo producto o sustancia tiene el efecto previsto en condiciones controladas, lo cual es esencial antes de que pueda utilizarse en la práctica agrícola.

3.3. Verificación de la eficacia biológica en condiciones de campo

La verificación de la eficacia biológica en condiciones de campo se refiere a la evaluación de la eficacia de sustancias o productos en el medio ambiente en condiciones de campo. A diferencia de las condiciones controladas que se encuentran en un fitotrón, las condiciones de campo incluyen una variedad de factores ambientales, como las condiciones meteorológicas variables, la composición variable del suelo y los efectos de los diferentes organismos en un ecosistema. Los pasos para verificar la eficacia biológica en condiciones de campo son:

1. Diseño del experimento en condiciones de campo: elaboración de un plan de investigación que tenga en cuenta las condiciones de campo específicas en las que se llevará a cabo el experimento;
2. Preparación del lugar: selección de una zona adecuada para el experimento, preparación del lugar en función de los objetivos de la investigación y aplicación de las salvaguardias necesarias, como normas éticas o permisos experimentales;

3. Aplicación de la sustancia o el producto: aplicación de la sustancia o el producto en condiciones naturales, teniendo en cuenta las características específicas de la sustancia o el producto, el tipo de cultivo y el medio ambiente;
4. Seguimiento de los parámetros biológicos del cultivo en el campo: realización de mediciones de plantas seleccionadas en parcelas, determinación de la emergencia, el vigor y la sanidad de las plantas, medición del contenido de clorofila y seguimiento de los índices de vegetación, es decir, NDVI.
5. Medición de la cantidad y la calidad del rendimiento.
6. Recogida de datos y análisis estadístico: análisis de los datos recogidos en el contexto del efecto de la sustancia o el producto sobre el crecimiento, el desarrollo y el rendimiento de la planta y la influencia de factores externos.
7. Verificar la eficacia biológica en condiciones de campo es importante porque proporciona información sobre cómo afectan los productos o sustancias a la planta en el entorno real. Este enfoque es fundamental en agricultura, conservación y ecología, donde las interacciones entre las plantas y su entorno son complejas y pueden ser difíciles de reflejar en condiciones de laboratorio.

En resumen, el proceso de verificación de la eficacia biológica de las formulaciones microbianas es un proceso de varios pasos que combina diversos métodos de ensayo. Prestar atención a la realización de pruebas precisas, fiables y representativas permite a los fabricantes ofrecer formulaciones microbianas eficaces en condiciones controladas y que cumplan las expectativas en un entorno agrícola diverso y dinámico.

3.4. Solubilidad, miscibilidad y estabilidad de los biopreparados

Comprobar la estabilidad de las formulaciones microbianas es un paso importante en su fabricación y uso. La estabilidad se refiere a la capacidad de un preparado para mantener sus propiedades biológicas, fisicoquímicas y microbiológicas durante un periodo determinado y en diversas condiciones de almacenamiento. Las pruebas de laboratorio evalúan si los microorganismos de la formulación conservan su capacidad de actividad para crecer y no se degradan cuando se exponen a diversos factores como la temperatura, la luz o la humedad. Las pruebas de estabilidad también incluyen el control de posibles cambios en la composición química de la formulación y la evaluación de si se está produciendo la degradación de las sustancias activas. Esto es importante porque la eficacia de una formulación microbiana en la agricultura depende en gran medida de que se mantenga la integridad de los microorganismos durante el almacenamiento. Unas pruebas de estabilidad minuciosas permiten a los fabricantes determinar con precisión la vida útil de una formulación y garantizar a los agricultores que se beneficiarán de un producto de calidad y eficacia constantes. Las pruebas se utilizan para evaluar durante cuánto tiempo un biopreparado conserva su eficacia en condiciones de almacenamiento, que pueden incluir el almacenamiento del biopreparado a diferentes temperaturas, la realización de análisis de la composición microbiana, como la evaluación del número de microorganismos viables y el análisis de la diversidad genética después de un determinado período, y la evaluación de los cambios físicos y químicos. La estabilidad se comprueba a varias escalas, desde pruebas de laboratorio a pruebas a escala piloto o pruebas de producción a gran escala, para evaluar si el producto mantiene sus propiedades durante las distintas etapas de producción y almacenamiento.

Comprobar la solubilidad de los preparados microbiológicos es un aspecto importante de su eficacia y uso. En este contexto, el proceso tiene por objeto evaluar en qué medida las formulaciones pueden disolverse y distribuirse uniformemente en diversas sustancias portadoras, como el agua u otros agentes auxiliares. Las

pruebas de solubilidad son esenciales porque afectan a la uniformidad de la aplicación de una formulación en la zona objetivo, determinando la eficacia y eficiencia de los microorganismos sobre el terreno. Los fabricantes suelen realizar estas pruebas en condiciones de laboratorio, simulando diversas condiciones de aplicación. En la práctica, las pruebas de solubilidad incluyen la evaluación del tiempo necesario para que el producto se disuelva completamente, el grado de disolución a diferentes temperaturas o pH, así como la evaluación de cualquier cambio fisicoquímico. Un seguimiento cuidadoso de estos parámetros permite a los fabricantes ajustar las formulaciones microbianas para garantizar métodos de aplicación óptimos. La preparación eficaz de las formulaciones microbianas para su aplicación es importante para su uso con éxito en la agricultura, la horticultura y la protección del medio ambiente. Las pruebas de solubilidad evalúan cómo se disuelve un bioproducto en agua de diferentes niveles de dureza u otras sustancias. Esto puede lograrse preparando soluciones de biopreparados en diversos agentes solubilizantes y evaluando el grado de solubilidad. Las pruebas de solubilidad no son necesarias para los productos sólidos que contengan microorganismos activos aplicados directamente a un medio sólido.

Le contrôle de la solubilité des préparations microbiologiques est un aspect important de leur efficacité et de leur utilisation. Dans ce contexte, le processus vise à évaluer dans quelle mesure les formulations peuvent se dissoudre et se distribuer uniformément dans diverses substances porteuses, telles que l'eau ou d'autres agents auxiliaires. Les tests de solubilité sont essentiels car ils affectent l'uniformité de l'application d'une formulation dans la zone cible, déterminant l'efficacité et l'efficience des micro-organismes sur le terrain. Les fabricants effectuent généralement ces tests en laboratoire, en simulant différentes conditions d'application. En pratique, les tests de solubilité comprennent l'évaluation du temps nécessaire pour que le produit se dissolve complètement, le degré de dissolution à différentes températures ou pH, ainsi que l'évaluation de tout changement physicochimique. Un suivi attentif de ces paramètres permet aux fabricants d'ajuster les formulations microbiennes afin de garantir des méthodes d'application optimales. Il est important de préparer efficacement les formulations microbiennes en vue de leur application pour qu'elles soient utilisées avec succès dans l'agriculture, l'horticulture et la protection de l'environnement. Les tests de solubilité évaluent la façon dont un bioproduit se dissout dans de l'eau de différents niveaux de dureté ou dans d'autres substances. Pour ce faire, on prépare des solutions de biopréparation dans divers agents solubilisants et on évalue le degré de solubilité. Les tests de solubilité ne sont pas nécessaires pour les produits solides contenant des micro-organismes actifs appliqués directement sur un support solide.

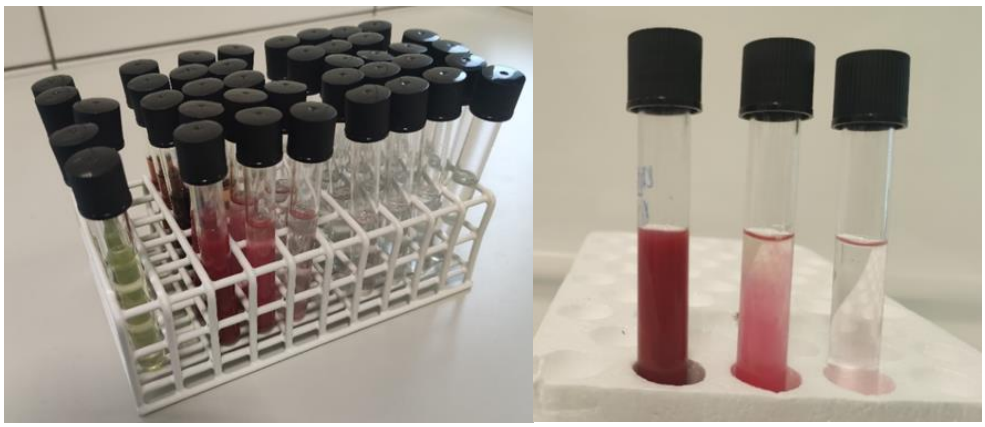

Fig. 4.12. Pruebas de mezclabilidad de productos agroquímicos con productos microbianos en un pulverizador multicomponente. Fuente: Intermag sp. z o.o.

Comprobar la miscibilidad y compatibilidad de las formulaciones microbianas con otras sustancias es un paso clave para su aplicación en la práctica agrícola. La miscibilidad se refiere a la capacidad de una formulación para mezclarse uniformemente con otras sustancias, como fertilizantes o pesticidas, sin formar depósitos indeseables o cambios en la estructura fisicoquímica. La compatibilidad, por su parte, se refiere a la capacidad de una formulación para interactuar con diferentes sustancias químicas sin perder su eficacia, es decir, en el caso de las formulaciones microbiológicas, manteniendo la viabilidad de los microorganismos activos. Las pruebas de mezclabilidad y compatibilidad se realizan en condiciones de laboratorio, donde se evalúan la estabilidad de la formulación en diferentes mezclas y las posibles interacciones con otras sustancias. Como resultado, los fabricantes pueden proporcionar a los agricultores formulaciones microbianas fácilmente miscibles con otros agentes utilizados en agrotecnología sin que pierdan su eficacia. Una investigación meticulosa en este ámbito ayuda a minimizar el riesgo de interacciones químicas indeseables, garantizando el uso eficaz y seguro de los preparados microbiológicos en la práctica agrícola (Ledakowicz 2012).

Referencias

Bednarski W., Fiedurek J. 2012. Podstawy biotechnologii przemysłowej. Wydawnictwo WNT.

Chaudhary T., Dixit M., Gera R., Shukla A.K., Prakash A., Gupta G., Shukla P. 2020. Techniques from improving formulation of bioinoculants. 3 Biotech, 10, 1-9.

Elander R.P., Chang L.T. 1979. Microbial Culture Selection. In: Peppler H.J., Perlman D. (eds.) Microbial Technology, Second Edition. Academic Press, 243-302.

Kuila A., Sharma V. (Eds.) 2018. Principles and Applications of Fermentation Technology. John Wiley & Sons.

Ledakowicz S. 2012. Inżynieria biochemiczna. Wydawnictwo WNT.

Olicón-Hernández D.R., Guerra-Sánchez G., Porta C.J., Santoyo-Tepole F., Hernández-Cortez C., Tapia-García E.Y., Chávez-Camarillo G.M. 2022. Fundaments and concepts on screening of microorganisms for biotechnological applications. Mini review. Current Microbiology, 79(12), 373.

Sana S., Sheikh A., Maheen Z., Mukhtar N., Ali S., Aftab M., Liaqat I. 2023. Fundamentals of Microbiology: A Laboratory Manual. Scintific Knowleadge Publisher.

Schlegel H.G. 2004. Mikrobiologia ogólna. Wydawnictwo Naukowe PWN.

Singleton P.W.; Keyser H.; Sande E. 2022. Development and Evaluation of Liquid Inoculants. In: Herridge D. (ed.) Inoculants and Nitrogen Fixation of Legumes in Vietnam. ACIAR Proceeding, 109e, 52-66.

Stackebrandt E., Smith D., Casaregola S., Varese G.C., Verkleij G., Lima N., Bridge P. 2014. Deposit of microbial strains in public service collections as part of the publication process to underpin good practice in science. SpringerPlus, 3, 1-4.

Steele D.B., Stowers M.D. 1991. Techniques for selection of industrially important microorganisms. Annual Review of microbiology, 45, 89-106.

Vassilev N., Vassileva M., Azcón R., Fenice M., Federici F., Barea J.M. 1998. Fertilizing effect of microbially treated olive mill wastewater on Trifolium plants. Bioresource technology, 66(2), 133-137.

Vassileva M., Malusà E., Sas-Paszt L., Trzcinski P., Galvez A., Flor-Peregrin E., Shilev S., Canfora L., Mocali S., Vassilev N. 2021. Fermentation Strategies to Improve Soil Bio-Inoculant Production and Quality. Microorganisms 9(6), 1254.