

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΙΠΑΣΜΆΤΩΝ

Περιεχόμενο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΜΒΟΛΙΩΝ.....	4
ΦΟΡΕΑΣ	9
Ξηρά εμβόλια (σκόνες)	11
Κόκκοι.....	14
Υγρά εμβόλια	14
Μέσα που βασίζονται σε πολυμερή (κυτταρική ακινητοποίηση)	15
Άλλα μέσα	17
Οι υποσχόμενες νέες τεχνολογίες για την ανάπτυξη των μέσων	18
ΣΥΝΔΕΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ.....	21
ΠΡΟΣΘΕΤΑ.....	22
ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ	23
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	23

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα περιβαλλοντικά προβλήματα όπως η ρύπανση των εσωτερικών υδάτων, η εξοικονόμηση ενέργειας και η διάβρωση του εδάφους, αναγκάζουν τους αγρότες να παρέχουν στρατηγικές ανάπτυξης που έχουν λιγότερο ρυπογόνες επιπτώσεις. Η χρήση των φιλικών προς το περιβάλλον πρακτικών προωθείται από την εθελοντική πιστοποίηση (π.χ.. GlobalGAP ή συστήματα βιολογικής γεωργίας), καθώς και από νομικά δεσμευτικές διατάξεις (π.χ. Οδηγία 2009/128 της ΕΕ σχετικά με την εφαρμογή πρακτικών για την αειφόρο διαχείριση των παρασίτων). Στο πλαίσιο αυτό, η μείωση της χρήσης χημικών λιπασμάτων, συνοδευόμενη από εκτεταμένη χρήση οργανικών λιπασμάτων θεωρείται δεσμευτικός τρόπος για να μειωθεί η επιβάρυνση στο περιβάλλον που προκύπτει από τις μέχρι τώρα πρακτικές. Κατά τα τελευταία χρόνια, τα χημικά φυτοφάρμακα και λιπάσματα διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο για την προώθηση της ανάπτυξης των αγροτικών περιοχών, αλλά έχουν μια σύντομη ιστορία στη σύγχρονη γεωργία. Η άμεση δράση τους και το σχετικό χαμηλότερο κόστος απαιτούν την ευρύτερη χρήση τους. Από την άλλη πλευρά, οι τοξικές επιδράσεις τους στο περιβάλλον, τα φυτά, τα ζώα και την ανθρώπινη ζωή αποκλίνουν το κεντρο της προσοχής προς περισσότερο φιλικές προς το περιβάλλον λύσεις. Επιπλέον, το πρόβλημα της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα έντομα έναντι των παρασιτοκτόνων που χρησιμοποιούνται συχνά δεν έχει ακόμη επιλυθεί. Με αυτόν τον

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΙΠΑΣΜΑΤΩΝ

τρόπο, οι πρακτικές όπως η Ολοκληρωμένη Διαχείριση Επιβλαβών Οργανισμών (ΟΔΕΟ - Integrated Pest Management - IPM), αποκτούν μεγαλύτερη σημασία.

Τα βιολιπάσματα είναι ένα ζωτικό τμήμα της ολοκληρωμένης διαχείρισης επιβλαβών οργανισμών. Μπορούν να έχουν μεγάλη οικονομική σημασία: να αντικαθιστούν εν μέρει κάποια αγροχημικά, τα οποία με τη σειρά τους γίνονται όλο και πιο ακριβά και η βελτίωσή τους, υπό το φως των επεκτεινόμενων αιτημάτων για πιο φιλικές προς το περιβάλλον γεωργικές πρακτικές δεν είναι κερδοφόρα. Ο όρος «Βιολίπασμα» αναφέρεται συνήθως σε ένα προϊόν που περιέχει μικροοργανισμούς του εδάφους το οποίο, όταν εφαρμόζεται στα φυτά, τονώνει την ανάπτυξη τους. Ωστόσο, ο όρος χρησιμοποιείται λανθασμένα και χρησιμοποιείται συχνά ως συνώνυμο για ένα ευρύ φάσμα προϊόντων, όπως για παράδειγμα το πράσινο λίπασμα ή η κοπριά, η απο κοινού ανάπτυξη αγροτικών καλλιεργειών ή τα βιολογικά εμπλουτισμένα χημικά λιπάσματα. Ο Vessey (2003) προσδιόρισε τα «βιολιπάσματα» ως «ένα υπόστρωμα που περιέχει ζωντανούς μικροοργανισμούς που όταν εφαρμόζονται στους σπόρους, τις επιφάνειες των φυτών ή του εδάφους, αποικίζουν τη ριζόσφαιρα ή το εσωτερικό του φυτού και τονώνουν την ανάπτυξη του μέσω αύξησης της διαθεσιμότητας των βασικών θρεπτικών συστατικών». Οι μικροοργανισμοί που περιέχουν τα λιπάσματα, ονομάζονται επίσης Ριζοβακτηρίδια που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (PGPR) (Plant Growth Promoting Rhizobacteria ή PGPR) και ασκούν μια ευεργετική επίδραση στο φυτό ξενιστή μετά τον εμβολιασμό.

Ο ενθουσιασμός για τη χρήση των προϊόντων αυτών αυξάνεται χάρη στη βελτιωμένη αποδοτικότητα της χρήσης των προσθέτων τροφίμων και την αυξανόμενη ζήτηση από την κοινωνία για πιο πράσινες τεχνολογίες και γαι τη μείωση του κόστους που συνδέεται με αγροχημικά. Επιπλέον, τα βιολιπάσματα και τα φυτοδιεγερτικά έχουν άλλα ευεργετικά αποτελέσματα, όπως αποτελεσματικά βιοεμβόλια. Πράγματι, οι μικροοργανισμοί όπως το *Rhizobium* και το *Glomus spp.* έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητά τους στη μείωση των νόσων σε ορισμένα φυτά. Η πρακτική του εμβολιασμό φυτών με PGPR μπορεί να παρακολουθηθεί μέχρι τον 20ο αιώνα, όταν το προϊόν που περιέχει *Rhizobium sp.* κατοχυρώθηκε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας. Για τους μυκορριζικούς μύκητες, αν και χρησιμοποιούνται ως βιολιπάσματα από μερικές δεκαετίες, ακόμα στα τέλη της δεκαετίας του '50 του περασμένου αιώνα, έχει αποδειχθεί ότι διεγείρουν την ανάπτυξη των φυτών, μέσω της απορρόφησης του φωσφόρου. Από τότε, οι ερευνητικές προσπάθειες σε αυτόν τον τομέα επεκτείνονται συνεχώς, με αποτέλεσμα την επιλογή διαφόρων στελεχών που επιδεικνύουν και μια ποικιλία από άλλες χρήσιμες ιδιότητες.

Οι πολιτικές για την υποστήριξη της βιώσιμης ανάπτυξης στην ύπαιθρο και οι επιστημονική έρευνα στον τομέα αυτό έχουν βελτιώσει την επάρκεια και τη συνέπεια του μικροβιακού εμβολιασμού. Οδήγησαν στην ενσωμάτωση μερικών στελεχών που χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα για βιολογικό έλεγχο και για βιολογική λίπανση. Αυτά είναι τα μυκορριζικά παρασκευάσματα και τα παρασκευάσματα PGPR τα οποία διατίθενται στο εμπόριο σε μερικές χώρες. Παρά την αυξημένη χρήση των μικροβιακών εμβολίων, ιδιαίτερα εκείνων που ενεργούν ως φυτοδιεγερτικά και των βιολιπασμάτων, η κατανάλωσή τους συχνά παρεμποδίζεται

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΙΠΑΣΜΑΤΩΝ

εξαιτίας των διακυμάνσεων και της ασυνέπειας των αποτελεσμάτων μεταξύ των δοκιμών εργαστηρίου, θερμοκηπίου και πεδίου. Η εξήγηση πίσω από αυτές τις αντιφάσεις έγκειται στην ελλιπή κατανόηση των περίπλοκων σχέσεων μεταξύ των μεμονωμένων συστατικών του συστήματος: φυτό, μικροοργανισμός και περιβαλλοντικές συνθήκες (και ιδίως οι συνθήκες του εδάφους). Επιπλέον, η έλλειψη κατάλληλων διατυπώσεων και οι δαπανηρές και γραφειοκρατικές διαδικασίες για την εγγραφή είναι επίσης μεταξύ των παραγόντων που εμποδίζουν την χρήση των PGPR σε ευρύτερη κλίμακα.

Η πραγματική εμπορευματοποίηση των PGPR ξεκίνησε το 1995 στις ΗΠΑ και το Ηνωμένο Βασίλειο με τον εμβολιασμό οσπρίων με *Rhizobium*. Ωστόσο, ο ενθουσιασμός για άλλα PGPR αυξήθηκε με την πάροδο του χρόνου και ένα ευρύ φάσμα νέων προϊόντων εισήλθαν στην αγορά. Τα περισσότερα PGPR που δεν περιέχουν *Rhizobium* χρησιμοποιούν βακτήρια του γένους *Azospirillum* (αζωτοδεσμευτικά βακτήρια που ζουν ελευθερά) ή *Bacillus* (μικροοργανισμοί που διαλύουν τα φωσφορικά άλατα) και παράγοντες βιοελέγχου. Επίσης, σε πολλά μέρη του κόσμο χρησιμοποιούνται προϊόντα που περιέχουν δενδροειδείς μυκορριζικούς μύκητες (ΔΜΜ). από την άλλη πλευρά, η ποικιλία των υφιστάμενων πληθυσμών των PGPR και ΔΜΜ στο έδαφος, το ευρύ φάσμα τους, και οι μηχανισμοί δράσης τους που δεν έχουν διευκρινιστεί καλά οδηγούν στην περιορισμένη χρήση τους. Επίσης, η πρακτική έχει δείξει ότι τα θετικά αποτελέσματα μπορεί να είναι ειδικά στα μεμονωμένα φυτά και στελέχη και μπορούν επίσης να ποικίλλουν δραματικά σε διαφορετικές φυσικές συνθήκες. Επιπλέον, αφού ενσωματωθούν στο έδαφος, οι μικροοργανισμοί αντιμετωπίζουν ανταγωνιστικές και συχνά σκληρές συνθήκες οι οποίες μπορούν να μειώσουν σοβαρά τα ευεργετικά αποτελέσματά τους.

Οι τέσσερις κύριοι τύποι διατυπώσεων των βιολιπασμάτων τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα, είναι υγρά λιπασματα, λιπασματα τύρφης, κόκκοι, και λυοφιλοποιημένες σκόνες (Εικ.1). Η επιτυχία τους εξαρτάται από την καλλιέργεια στόχο, την τιμή, τη διαθεσιμότητα της αγοράς, τους περιβαλλοντικούς περιορισμούς και την πολυπλοκότητα της εφαρμογής τους. Μία από τις κύριες δυσκολίες για τον κλάδο είναι η ανάπτυξη ενός βελτιωμένου τύπου που συνδυάζει όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά και η οποία είναι κατάλληλη για χρήση υπό συνθήκες πεδίου. Επιπλέον, αν και ορισμένοι μικροοργανισμοί μπορεί να φαίνονται πολύ υποσχόμενοι στο εργαστήριο, η παραγωγή τους για εμπορικούς σκοπούς αποτελεί ένα δύσκολο έργο, δεδομένου της ευρύ φάσματος των συνθηκών στο πεδίο. Μερικοί κατασκευαστές περιλαμβάνουν τουλάχιστον δύο τύπους μικροοργανισμών (π.χ.. *Rhizobium* και ΔΜΜ, *Rhizobium* και PSB фосфат-разтварящи микроорганизми, διαφορετικά στελέχη των ΔΜΜ ή των PSB) σε ένα προϊόν. Έτσι αυξάνονται τα επακόλουθα οφέλη για τα φυτά ξενιστές. Ωστόσο, μόνο μερικές αναφορές αντανακλούν τις θετικές επιπτώσεις τους ως εμβόλια. Η αποτελεσματικότητά τους δεν έχει αποδειχθεί και η παραγωγή και η εμπορία τους δημιουργούν διάφορες τεχνικές δυσκολίες. Η πιο σημαντική πτυχή στην ανάπτυξη ενός εμβολίου είναι η διασφάλιση της ποιότητας κατά τρόπο που να μπορεί να εξασφαλίζει την αξιοπιστία των προϊόντων με μέγιστες πιθανότητες για επιτυχία. Η έλλειψη συνέπειας στα αποτελέσματα που επιτεύχθηκαν σε συνθήκες πεδίου, λόγω της μεταβλητής ποιότητας έχει τεράστια επιρροή στην εμπορευματοποίηση των βιολιπασμάτων.

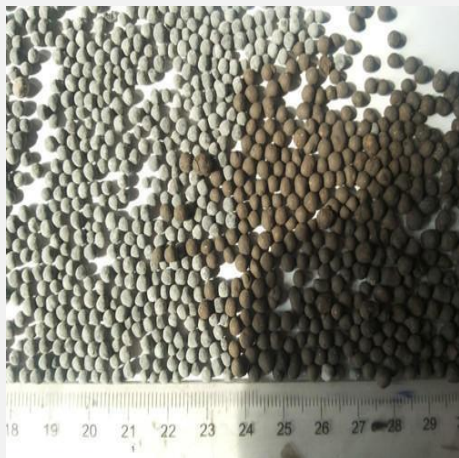
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΙΠΑΣΜΆΤΩΝ



A



B



C



D

Εικ. 1. Τύποι παρασκευασμάτων των βιολιπασμάτων: A - υγρό; B - τύρφη, C – κόκκοι και D - ενθυλακωμένες λυοφιλοποιημένες σκόνης.

Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΜΒΟΛΙΩΝ

Η ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου αποτελεί μια πολυσταδιακή διαδικασία που περιλαμβάνει την ενσωμάτωση ενός ή περισσότερων στελεχών μικροοργανισμών σε ένα συγκεκριμένο φορέα μαζί με συνδετικούς παράγοντες και / ή άλλα πρόσθετα, που εξασφαλίζουν την προστασία των κυττάρων κατά την αποθήκευση και τη μεταφορά. Επειδή τα εμβόλια

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΙΠΑΣΜΑΤΩΝ

αποθηκεύονται συχνά σε μη-βέλτιστες συνθήκες (π.χ., υψηλή θερμοκρασία, έκθεση στο φως), θα πρέπει να έχουν μια εκτεταμένη διάρκεια αποθήκευσης, δηλαδή οι μικροοργανισμοί πρέπει να είναι βιώσιμοι και να έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν σε αντίξοες συνθήκες. Το καλό σκεύασμα πρέπει επίσης να εξασφαλίσει την αποτελεσματική ενσωμάτωση των μικροοργανισμών στο έδαφος και να ενισχύσει τη δραστηριότητά τους, προκειμένου να μεγιστοποιηθούν τα οφέλη από τον εμβολιασμό των φυτών ξενιστών. Για να υιοθετηθεί εύκολα από τους αγρότες, το εμβόλιο πρέπει να είναι οικονομικό και εύκολο στο χειρισμό και χρήση, για να εξασφαλίσει ότι οι μικροοργανισμοί θα προμηθεύονται με τον πιο κατάλληλο τρόπο και μορφή. Η παρασκευή του σκευάσματος είναι ένα κρίσιμο ζήτημα, αλλά δυστυχώς έχει διεξαχθεί περιορισμένος αριθμός μελετών πάνω στο θέμα αυτό. Τα διαθέσιμα στοιχεία δείχνουν ότι από τη δεκαετία του '80 του περασμένου αιώνα, οι περισσότερες έρευνες πάνω στα *Rhizobia* επικεντρώνονται στην βακτηριακή γονιδιωματική και φυσιολογία και λιγότερο από 1% πάνω στις πτυχές των σκευασμάτων των εμβολίων. Σε κάθε περίπτωση, υπάρχει πραγματική ανάγκη βελτίωσης των εμβολίων για να είναι δυνατή η συνέχιση της αποτελεσματικής ανάπτυξης και της εμπορευματοποίησης των νέων βιολιπασμάτων που να είναι πιο επιτυχή, πιο σταθερά με την πάροδο του χρόνου, με καλύτερη ποιότητα και να πληρούν όλες τις άλλες γεωργικές ανάγκες.

Ένα ιδανικό σκεύασμα δεν υπάρχει και προφανώς κάθε είδους βιολίπασμα έχει τα δικά του πλεονεκτήματα και περιορισμούς. Ωστόσο, υπάρχουν κάποια κρίσιμα βήματα που πρέπει να ληφθούν πλήρως υπόψη κατά την παραγωγή βιολιπασμάτων. Η επιλογή που γίνεται σε αυτά τα βήματα μπορεί να προδικάσει την επιτυχία ή την αποτυχία του εμβολιασμού. Η επιλογή των μικροοργανισμών που πρέπει να εμβολιαστούν είναι ζωτικής σημασίας. Μερικά από τα πιο σημαντικά επιθυμητά χαρακτηριστικά του στελέχους του εμβολίου (βακτηριακό ή μυκητιασικό) περιλαμβάνουν τη γενετική σταθερότητά του, την ικανότητά του να είναι χρήσιμο για τις καλλιέργειες στοχους, να είναι ανταγωνιστικό με τους φυσικούς μικροβιακούς πληθυσμούς, να μεταναστεύει από την θέση του εμβολιασμού στο φυτό ξενιστή και να είναι ικανό να επιβιώσει κάτω από αντίξοες συνθήκες στο έδαφος χωρίς την παρουσία του ξενιστή. Άλλα σημαντικά χαρακτηριστικά που έχουν ιδιαίτερη σημασία κατά τη διάρκεια της παραγωγής είναι η δυνατότητα του στελέχους να καλλιεργείται σε συνθήκες εργαστηρίου (με εξαίρεση των ΔΜΜ, οι οποίοι δεν μπορεί να αναπτυχθούν χωρίς ένα φυτό ξενιστή), την ικανότητα να αναπτύσσεται ή να επιβιώνει σε φορείς (κατα τον χρόνο συγκέντρωσης ή αποθήκευσης), πάνω στους σπόρους και στο έδαφος, καθώς και να είναι συμβατός με τα αγροχημικά προϊόντα που ενδεχομένως θα χρησιμοποιηθούν στις καλλιέργειες. Το ζώντανό εμβόλιο πρέπει επίσης να είναι σε θέση να ξεπεράσει τις διάφορες τεχνολογικές διαδικασίες κατά τη διάρκεια της παραγωγής και να διατηρήσει τις λειτουργικές ιδιότητες του. Τα βακτηριακά εμβόλια τυπικά καλλιεργούνται σε υγρό μέσο για την επίτευξη υψηλών αποδόσεων από τη βιομάζα. Η σύνθεση του μέσου και οι συνθήκες ανάπτυξης (θερμοκρασία, pH, ανάδευση, εξαερισμός, κ.λπ.) έχουν άμεση σχέση με τις φυσιολογικές-βιοχημικές ιδιότητες του συγκεκριμένου στελέχους και τον τύπο του εμβολίου, το οποίο θα παράγεται. Οι προκύπτοντες βακτηριακές καλλιέργειες χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό διαφόρων φορέων (ενθυλάκωση ή εμποτισμός τύρφης και κόκκων) είτε για την παρασκευή δραστικών υγρών σκευασμάτων μετά την προσθήκη των κατάλληλων προσθέτων. Η μεγάλη

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΙΠΑΣΜΑΤΩΝ

κλίμακας παραγωγή ομοιογενών βακτηριακών καλλιεργειών σε βιοαντιδραστήρες είναι μια ευρέως διαδεδομένη πρακτική (Εικ.2).



Εικ.2. Μαζική παραγωγή Azolla

Μόλις επιλεχθεί το ειδικό στέλεχος / στελέχη για το εμβόλιου μπορεί να προσδιοριστεί μια τυποποιημένη διαδικασία παρασκευής. Ωστόσο, για τα βιολιπάσματα, σε αντίθεση με τα βιοφυτοφάρμακα, το κόστος παραγωγής είναι ένα σημαντικό εμπόδιο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η τιμή των βιολιπασμάτων δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από εκείνη των συμβατικών λιπασμάτων. Ως εκ τούτου, ως μέσο ανάπτυξης για τα PGPR, πρέπει να χρησιμοποιούνται φθηνές πρώτες ύλες (π.χ.. ορός γάλακτος, ιδατικά ιζήματα, κοπρόχωμα και άλλα.). Μια άλλη προσέγγιση για τη μείωση του κόστους παραγωγής είναι η χρήση αγροτοβιομηχανικών υπολειμμάτων, εμπλουτισμένων με φυσικά φωσφορικά. Κατά τη διάρκεια της λιπασματοποίησης ή τση ζύμωσης, οι ελεύθεροι ή ακινητοποιημένοι μικροοργανισμοί οι οποίοι παράγουν οργανικά οξέα, προστίθενται στο πλέγμα, βελτιώνοντας τη διαλυτότητα του φωσφορικού και με αυττον τρόπο αυξανουν την πρόσβασή του στα φυτά.

Πρόσφατα, η χρήση βιομεμβρανών επίσης εφαρμόστηκε ως ένα πιθανό μέσο για την παραγωγή αποτελεσματικών της ενοφθαλμισμάτων. Οι βιομεμβράνες αποτελείται από μικροβιακά κύτταρα, ενσωματωμένα σε ένα πολυμερές πλέγμα (επίσης γνωστό ως εξωκυτταρική πολυμερής ουσία ΕΠΟ) και προσκολλημένα σε μια αδρανή ή ζωντανή επιφάνεια η οποία παρέχει

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΙΠΑΣΜΆΤΩΝ

δομή και προστασία της βακτηριακής καλλιέργειας. Παρατηρούνται τρεις κύριοι τύποι βιοφίλμ στο έδαφος: βακτηριακά (συμπεριλαμβανομένων των Actinomycetes), μυκητιακά και μυκητιασικά-βακτηριακά. Τόσο οι βακτηριακές όσο και οι μυκητιασικές βιομεμβράνες σχηματίζονται σε αβιοτικές επιφάνειες. Οι αποικίες μυκήτων παίζουν το ρόλο της βιοτικής επιφάνειας κατά τον σχηματισμό των μυκητιασικών-βακτηριακών βιοφίλμ. Η πλειοψηφία των βακτηρίων που υπάρχουν στα ρίζες και το έδαφος, σχηματίζουν βιοφίλμ. Ως εκ τούτου, η εφαρμογή των στελεχών PGPR που σχηματίζουν βιοφίλμ μπορεί να είναι μια επιτυχημένη στρατηγική για την ανάπτυξη και την παραγωγή βιολιπασμάτων. Ενώ οι εκτομυκορριζικοί μύκητες μπορούν να παραχθούν κατά τη ζύμωση, η καλλιέργεια των εμβολιαστών από δεονδροειδή μυκορριζικούς μύκητες είναι πολύ πιο δύσκολη λόγω της ανάγκης για φυτό ξενιστή. Οι πρώτες προσπάθειες για την παραγωγή ΔΜΜ βασίζονται σε φυτά σε γλάστρες με μείγματα χωμάτων ή σε αεροπονία. Με την ανάπτυξη των μονοξενικών καλλιεργειών στα τέλη της δεκαετίας του '80, έγινε δυνατή η παραγωγή ΔΜΜ υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες. Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για την παρασκευή σπορίων με τη χρήση συν-καλλιέργειας τρυβλίων Petri (split-plate) και μέσω μετασχηματισμένων ριζών καρότου με Ri πλασμιδιακό DNA του *Agrobacterium*. Η μέθοδος επιτρέπει την παραγωγή κατά μέσο όρο 15 000 σπορίων ανά τριβλίο petri για μια περίοδο 4-5 μηνών μετά την έναρξη του κύκλου παραγωγής. Ωστόσο, αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για φυσιολογικές και εργαστηριακές δοκιμές. Βελτιώσεις αυτής της μεθόδου έχουν επιτευχθεί μέσω της περιοδικής αλλαγής του περιβάλλοντος στο περιφερικό διαμέρισμα κάθε δεύτερο μήνα με παράλληλο συμπλήρωμα γλυκόζης στο εγγύ διαμέρισμα. Τα αποτελέσματα οδηγούν στην παραγωγή περίπου 65.000 σπορίων μετά από επτά μήνες. Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούνται κυρίως για την πειραματική παραγωγή σπορίων ή για τη συντήρηση των τραπεζών γονιδίων. Ο λόγος είναι ότι το μέσο ετήσιο κόστος παραγωγής ενός σπορίου φτάνει τα 30-50 δολάρια ΗΠΑ, ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται. Μεγάλης κλίμακας παραγωγή in vitro των μυκορριζικών μυκήτων, κατάλληλη για εφαρμογή σε εμπορική κλίμακα, αναπτύχθηκε πρόσφατα. Η μέθοδος βασίζεται σε μερικούς βασικούς παράγοντες: επιλογή των κατάλληλων μετασχηματισμένων ριζών καρότων με Ri πλασμιδιακό DNA του *Agrobacterium* για διάφορα είδη ΔΜΜ, επιλογή και διατήρηση ενός βέλτιστου περιβάλλοντος για την ανάπτυξη και την εφαρμογή διαδικασιών για τη διασφάλιση της ποιότητας.

Ωστόσο, εμπορικά εμβόλια που περιέχουν είδη ΔΜΜ εξακολουθούν να παράγονται κυρίως μέσω ανάπτυξης σε φυτά ξενιστές κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες, με την προσθήκη διαφόρων μυκητικών δομών (σπόρια, μυκήλιο) και περιέχουν υπολείμματα μυκορριζικών ριζών φυτών τα οποία χρησιμοποιούνται ως υλικό πολλαπλασιασμού (όπως για παράδειγμα σόργο, καλαμπόκι, κρεμμύδι, ή *Plantagolanceolata*) (Εικ. 3). Αυτό μπορεί να θεωρηθεί ως μια κλασική μέθοδο στην οποία υποστρώματα άμμου / εδάφους ή / και άλλων υλικών (π.χ., Ζεόλιθος, περλίτης) χρησιμοποιούνται για την μαζική παραγωγή εμβολίου δενδροειδών μυκορριζικών μυκήτων σε γλάστρες, σακούλες ή κοίτες για εφαρμογές μεγάλης κλίμακας. Τα κρίσιμα στοιχεία αυτής της στρατηγικής παραγωγής είναι:

- i. χρησιμοποίηση γνωστών ειδών ΔΜΜ

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΙΠΑΣΜΆΤΩΝ

- ii. Επιλογή βραχύβιων ξενιστών, με επαρκώς αναπτυγμένο ριζικό σύστημα, υψηλό επίπεδο αποικισμού με ένα ευρύ φάσμα δενδροειδών μυκορριζικών μυκήτων και ανοχή σε σχετικά χαμηλά επίπεδα του φωσφόρου,
- iii. έλεγχος της στάθμης των ορυκτών προσθέτων στο έδαφος,
- iv. κατάλληλος συνδυασμός των ειδών ΔΜΜ και των φυτών ξενιστών.

Με την τεχνική αυτή είναι δυνατόν να επιτευχθεί μια πυκνότητα του εμβολίου των 80-100 χιλιάδων σπορίων ανα λίτρο, που είναι ικανά να βλαστήσουν. Αυτό συνεπάγεται την ανάγκη για αραίωση του ενοφθαλμίσματος με έναν φορέα για την παρασκευή ενός εμπορικού προϊόντος.



Εικ.3. Οζίδια ρίζας *Plantago lanceolate*

Δεδομένου ότι οι μικροβιακές συσχετίσεις μεταξύ βακτηριακών και μυκορριζικών μυκήτων που βρίσκονται φυσικά στο χώμα, μπορούν να διεγείρουν τη συμβιωτική με τα φυτικά είδη, είναι πιθανό ότι σχηματισμοί οι οποίοι περιλαμβάνουν δύο ή περισσότερα διαφορετικά PGPR θα μπορούσαν να ενισχύσουν τις ευεργετικές επιδράσεις στα φυτά. Μικροβιακές κοινοπραξίες μπορούν να διεγείρουν την ανάπτυξη των φυτών ενός συνόλου μηχανισμών που βελτιώνουν την απορρόφηση των θρεπτικών ουσιών και αναστέλλουν τους παθογόνους μύκητες. Οι διαφορετικοί μηχανισμοί που προτείνονται για να εξηγήσουν αυτή την τόνωση της ανάπτυξης, βασίζονται στην αυξημένη ταχύτητα κυκλοφορίας των θρεπτικών ουσιών. Η τελευταία οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα σε μικροοργανισμούς και την πλούσια βιοποικιλότητα στο έδαφος. Ο ταυτόχρονος εμβολιασμός με διαφορετικά PGPR ή / και ΔΜΜ συχνά καταλήγει σε αυξημένη ανάπτυξη και απόδοση, σε σύγκριση με τον εμβολιασμό με ένα είδος, ιδιαίτερα μέσω της βελτίωσης της απορρόφησης των θρεπτικών ουσιών. Πράγματι, η αλληλεπίδραση μεταξύ των βακτηρίων και των δενδροειδών μυκορριζικών μυκήτων έχει θετική επίδραση στην απορρόφηση

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΙΠΑΣΜΑΤΩΝ

των θρεπτικών συστατικών, ειδικά όταν τα PGPR και τα αζωτοδεσμευτικά βακτηρίδια βρίσκονται σε συνδυασμό. Ο εμβολιασμός καλαμποκιού και γκαζόν με *A. brasilense* και ΔΜΜ οδηγεί σε μια περιεκτικότητα σε Ν και Ρ που είναι συγκρίσιμη με τα φυτά που καλλιεργούνται με λίπασμα. Ο συν-εμβολιασμός με διαφορετικούς τύπους ΔΜΜ είναι συνήθως πιο αποτελεσματικός λόγω της έλλειψης ειδικότητας για αποικισμό σε σχέση με τα είδη / τις ποικιλίες φυτών.

Η συνεργιστική αλληλεπίδραση μεταξύ δενδροειδών μυκορριζικών μυκήτων και μερικών ειδών PGPR, συμπεριλαμβανομένων των *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, και *Pseudomonas*, έχει επίσης δειχθεί ως επωφελής για την ανάπτυξη των φυτών. Ο βελτιωμένος αποικισμός των ριζών μέσω ΔΜΜ παρατηρείται όταν οι μυκορριζικοί μύκητες είναι συν-εμβολιασμένοι με τέτοιο PGPR. Βρέθηκε τέσσερις φορές μεγαλύτερος αριθμός ριζών οξιδίων όταν τα φυτά εμβολιάστηκαν με ένα μίγμα που περιέχει *Glomus deserticola* και *Rhizobium trifoli*, σε σύγκριση με τον εμβολιασμό μόνο με *R. trifoli*. Ενισχυμένη μυκώριζα και σχηματισμός οξιδίων παρατηρείται γκαί κατά τον εμβολιασμό με συν-ενθλακωμένα *R. trifoli* και *Yarrowia lipolytica*. Ο εμβολιασμός με *Rhizobia* και ΔΜΜ που σχηματίζουν οξίδια οδηγεί σε αύξηση, τόσο της αποτελεσματικότητας απορρόφησης φωσφόρου, όσο και αζώτου. Η εφαρμογή του PGPR ως εμπορικό βιολίπασμα που περιέχει κοινοπραξίες από διαφορετικά είδη μικροοργανισμών οδηγεί συχνά σε μια μείωση του βαθμού των λοιμώξεων, σε καλύτερη απορρόφηση των ανόργανων συστατικών και σε αυξημένη ανάπτυξη των φυτών. Όλα αυτά τα παραδείγματα είναι ενδεικτικά για την ευκολία και την υψηλότερη εφαρμοσιμότητα των βιολιπασμάτων που αποτελούνται από δύο ή περισσότερα είδη μικροοργανισμών που έχουν διαφορετικούς μηχανισμούς για την τόνωση της ανάπτυξης. Η δυνατότητα να δοκιμαστούν μερικά στελέχη PGPR και ΔΜΜ σε διάφορους τύπους καλλιεργειών και υπό διαφορετικές συνθήκες πεδίου θα πρέπει να επιτρέψει την επιλογή των κοινοπραξιών κατάλληλων για εμπορικούς σκοπούς.

ΦΟΡΕΑΣ

Το μέσο είναι το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την παράδοση των ζώντων μικροοργανισμών από το εργοστάσιο παραγωγής έως το πεδίο. Είναι το κύριο στοιχείο (κατ'όγκο ή βάρος) του εμβολίου και είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση του σωστού αριθμού βιώσιμων κυττάρων σε καλή φυσιολογική κατάσταση. Ο φορέας εξασφαλίζει μια προσωρινή προστασία των μικροβιακών εμβολίων στο έδαφος: φυσικά, μέσω της δημιουργίας μιας προστατευτικής επιφάνειας που αποτελείται από μικροπόρους (μικρο-περιβάλλοντα) και με τρόφιμα, παρέχοντας ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα. Το ιδανικό μέσο πρέπει να έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- ✓ παρέχει ένα κατάλληλο μικροπεριβάλλον του/των μικροοργανισμού (-ων) στόχου (-ων).

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΙΠΑΣΜΑΤΩΝ

✓ παρέχει τις αναγκαίες φυσικές και χημικές ιδιότητες: Η ικανότητα κατακτάτισης υγρασίας (υψηλή χωρητικότητα για κατακράτηση νερού), ρυθμιστική ικανότητα του pH, και εύκολη ρύθμιση του pH.

✓ σταθερότητα κατά την διάρκεια της διαδικασίας: το μέσο πρέπει να είναι χημικός και φυσικός αδρανής. Είναι απαραίτητο να είναι στείρο ή να επιτρέπει την εύκολη αποστείρωση (αποστείρωση σε αυτόκλειστο ή με άλλες μεθόδους), να μην έχει ανομοιομορφίες, να επιτρέπει την εύκολη άλεση και ανάμιξη με άλλες ουσίες (θρεπτικές ουσίες, έκδοχα) με σάνταρ βιομηχανικό εξοπλισμό. Πρέπει επίσης να είναι δυνατό να χρησιμοποιείται ένα ευρύ φάσμα βακτηριακών ή μυκητιακών ειδών και στελεχών.

✓ εύκολη αποθήκευση και εμβολιασμός: το καλό μέσο πρέπει να εξασφαλίζει επαρκές χρονικό διάστημα χρησιμοποίησης (τουλάχιστον 2 - 3 μήνες σε θερμοκρασία δωματίου), πρέπει να προσκολλά σταθερά στους σπόρους και μπορεί να διατηρηθεί πάνω στους σπόρους, να επιτρέπει την ταχεία και ελεγχόμενη απελευθέρωση των μικροοργανισμών στο χώμα.

✓ οικονομικά και περιβαλλοντικά βιώσιμα: αυτό σημαίνει χαμηλότερη τιμή, διαθεσιμότητα, αξιοπιστία και ποιότητα. Το μέσο δεν θα πρέπει να περιέχει τοξικό υλικό, πρέπει να είναι βιοδιασπώμενο, με ελάχιστο κίνδυνο για το περιβάλλον (εξάπλωση κυττάρων στην ατμόσφαιρα ή στα υπόγεια ύδατα).

Η επιλογή του μέσου καθορίζει τη φυσική μορφή του εμβολίου, και είναι προφανές ότι δεν υπάρχει ένα καθολικό μέσο, κατάλληλο για όλους τους τύπους των μικροοργανισμών (Πίνακας 1). Τα μέσα μπορεί να είναι διαφορετικής προέλευσης (οργανικά, ανόργανα ή συνθετικά), και μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κύριες κατηγορίες:

- ✓ Εδάφη: τύρφη, άνθρακας, άργιλο, λιγνίτης, ανόργανο χώμα
- ✓ φυτικά απορρίμματα, ξυλάνθρακας, κοπρόχωμα, κοπριά, κυτταρίνη, άλευρο σόγιας, σογιέλαιο και αραχιδέλαιο, πίτουρο σιταριού, πιεσμένη λάσπη, κώνοι αραβοσίτου
- ✓ συσσωματώματα: βερμικουλίτη, περλίτης, φωσφορικό άλας, μπεντονίτης, θειικό ασβέστιο, πηκτές πολυακρυλαμίδιου, σφαιρίδια αλγινικού,
- ✓ Κοινές λυοφιλοποιημένες μικροβιακές καλλιέργειες και αποξηραμένα βακτήρια, μπορούν να ενσωματωθούν αργότερα σε ένα στερεό υπόστρωμα ή να χρησιμοποιηθούν στην τρέχουσα κατάσταση τους

Είναι επίσης δυνατό να παραχθούν μέσα που κατασκευάζονται από ένα συνδυασμό από τα ακόλουθα υλικά: μίγμα από χώμα και κοπρόχωμα, χώμα, τύρφη, φλοιοί και φλούδες, και τα παρόμοια. Συνήθως χρησιμοποιούνται τέσσερις μορφές διασποράς: ξηρό εμβόλιο (σκόνες), εναιωρήματα (εμβόλια σκόνης που εναιωρούνται σε ένα υγρό), κόκκοι και υγρά. Η τύρφη είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο μέσο, ειδικά για τα βακτηριακά ενοφθαλμίσματα. Ωστόσο, αυτή δεν είναι άμεσα διαθέσιμη σε όλο τον κόσμο, και η χρήση της έχει αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον και το οικοσύστημα από την οποία παράγεται. Αυτό τονίζει την ανάγκη για την ανάπτυξη νέων σκευασμάτων, που χρησιμοποιούν εναλλακτικά υλικά, τα οποία μπορούν να ανταγωνίζονται με τα ήδη υπάρχοντα σκευάσματα.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΙΠΑΣΜΑΤΩΝ

Ξηρά εμβόλια (σκόνες)

Τα ξηρά εμβόλια παρέχονται μέσω του εδάφους, των οργανικών ή αδρανών μέσων. Σε πολλά μέρη του κόσμου, τα ενοφθαλμίσματα διαμορφώνονται με τη βοήθεια της τύρφης (μέσου του εδάφους). Η τύρφη αποτελείται από μερικώς αποικοδομημένη χλωρίδα που έχει συσσωρευτεί με τα χρόνια. Παρέχει τρόφιμα και προστατευτικό περιβάλλον για μια ευρεία ποικιλία μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν και σχηματίζουν μικροαποικίες, τόσο στην επιφάνεια των σωματιδίων όσο και στους πόρους. Για να είναι κατάλληλη για χρήση η τύρφη δεν πρέπει να είναι τοξική (για τους μικροοργανισμούς, τα φυτά, τα ζώα και τους ανθρώπους), να προσροφάει έντονα, να επιτρέπει την εύκολη αποστείρωση, να έχει υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικές ουσίες και ικανότητα συγκράτησης νερού, και να είναι προσιτή στην αγορά. Η τύρφη χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της εύκολης προσβασιμότητας της. Ωστόσο, η επεξεργασία της είναι δαπανηρή δεδομένου ότι απαιτεί μερικά στάδια πριν να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φορέας για το εμβόλιο. Η προκύπτουσα τύρφη πρέπει να φιλταριστεί από το χονδροειδές υλικό πριν να στεγνώσει αργά και να φτάσει σε ένα μίγμα με περίπου 5% υγρασία. Αυτό το βήμα της αφυδάτωσης είναι κρίσιμη, δεδομένου ότι μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό τοξικών ενώσεων. Η διαδικασία πρέπει να διεξάγεται στις χαμηλότερες δυνατές θερμοκρασίες και δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τους 100 °C. Η ξήρανση στον αέρα είναι η προτιμώμενη μέθοδος αντί να χρησιμοποιείται κλίβανο. Ο τύπος της τύρφης και το επιθυμητό μέγεθος σωματιδίων προσδιορίζουν τον βαθμό της ξήρανσης. Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η περιεκτικότητα σε υγρασία πρέπει να είναι συνεπής με την μετέπειτα προσθήκη μιας υγρής καλλιέργειας έτσι ώστε η τελική περιεκτικότητα του υποστρώματος να αντιστοιχεί στο επιθυμητό επίπεδο. Μετά την ξήρανση η τύρφη αλέθεται, σθνήθως περνά από κόσκινο με μάτι τουλάχιστον 250 mm. Συνήθως οι καταθέσεις τύρφης έχουν χαμηλό pH που πρέπει να ρυθμιστεί σε pH 6.5-7.0. Στη συνέχεια, η τύρφη αποστειρώνεται και σε αυτή προστίθεται η απαιτούμενη ποσότητα του υγρού εμβολίου.

Στην περίπτωση ενός βακτηριακού εμβολίου είναι συνήθως αποδεκτό ένα τελικό περιεχόμενο υγρασίας ύψους 40-55%. Η εμβολιασμένη τύρφη πρέπει να επωαστεί για ένα χρονικό διάστημα για να επιτραπεί ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων στο μέσο. Αυτό το στάδιο, που ονομάζεται επίσης ωρίμανση ή σκλήρυνση είναι μεγάλης σημασίας, διότι βελτιώνει το βαθμό επιβίωσης των βακτηρίων κατά την αποθήκευση και στους σπόρους. Η τύρφη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για δενδροειδή μυκορριζικούς μύκητες και για εκτομυκορριζικά εμβόλια, αν και τα τελευταία δεν χρησιμοποιούνται ευρέως εκτός από τις περιπτώσεις αναγέννησης δασών. Οι εκτομυκορριζικοί μικροοργανισμοί καλλιεργούνται σε ένα μέσο που περιέχει γλυκόζη και τα παραγόμενα σπόρια χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό. Οι μυκηλιακές καθαρές καλλιέργειες προτιμώνται, επειδή αναστέλλουν την ανάπτυξη των παθογόνων και άλλων ρυπαντικών ουσιών. Τα εκτομυκορριζικά εμβόλια μπορούν να παρασκευαστούν και με τη χρήση ενός φορέα φτιαγμένο από βερμικουλίτη, και 5-10% τύρφη, υγροποιημένο με άλατα και ένα μέσο καλλιέργειας που περιέχει γλυκόζη. Αυτό το σκεύασμα παρέχει μια ισχυρή ρυθμιστική ικανότητα (διατηρώντας ένα pH μικρότερο από 6), και ενισχύει την παραγωγή φοθλβικού οξέος η οποία διεγείρει την ανάπτυξη.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΙΠΑΣΜΑΤΩΝ

Πίνακας 1. Πλεονεκτήματα και οι περιορισμοί στα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα μέσα

Μέσο	Πλεονεκτήματα	Περιορισμοί
Τύρφη	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Κατάλληλη για ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών: βακτήρια, ΔΜΜ, εκτομυκοριζικοί μικροοργανισμοί ➤ Προστατευτικό θρεπτικό μέσο ➤ Η περιεκτικότητα σε υγρασία μπορεί να ρυθμιστεί για να βελτιωθεί η ανάπτυξη και η επιβίωση των βακτηρίων κατά την διάρκεια της συμπίεσης, της αποθήκευσης και του εμβολιασμού ➤ Ισχυρή ρυθμιστική ικανότητα 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Δύσκολα προσιτή ➤ Ισχυρή αρνητική επίδραση στο περιβάλλον και τα οικοσυστήματα ➤ Δαπανηρές επενδύσεις για την εξόρυξη ➤ Τοξικές ενώσεις που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της ζήρασης και αποστείρωσης ➤ Υψηλή μεταβλητότητα στη σύνθεση και την ποιότητα ανάλογα με την προέλευση ➤ Εφαρμογή σε σπόρους: επαφή με άλλες χημικές ενώσεις (τοξικότητα)
Υγρό	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Εύκολο στη χρήση και εφαρμογή ➤ Εύκολη ρύθμιση των προσθέτων που απαιτούνται για την ανάπτυξη ή την επιβίωση των κυττάρων ➤ Η σύνθεση είναι εύκολα αναγνωρίσιμη και ελέγξιμη ➤ Υψηλή κυτταρική συγκέντρωση → χαμηλή επαναληψιμότητα της εφαρμογής του παρασκευάσματος 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Έλλειψη προστασίας του μέσου: χαμηλή βιωσιμότητα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και πάνω στους σπόρους ➤ Χαμηλές θερμοκρασίες αποθήκευσης (4 °C) ➤ Περιορισμένη διάρκεια ζωής ➤ Πιο ευαίσθητα σε συνθήκες στρες
Κόκκοι	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Εύκολοι για αποθήκευση, χειρισμό και εφαρμογή ➤ Πιο συμπυκνωμένοι από την τύρφη ➤ Οι ποσότητες για εφαρμογή αξιολογούνται εύκολα ➤ Εφαρμογή στο χώμα: δεν έχουν άμεση επαφή με άλλες χημικές ενώσεις (έλλειψη τοξικότητας) ➤ ιδιαίτερα αποτελεσματικοί υπό ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ογκώδεις: υψηλό κόστος μεταφοράς και αποθήκευσης ➤ Μεγαλύτερες ποσότητες κατά την εφαρμογή ➤ Συχνά χρησιμοποιούνται μη αποστειρωμένα μέσα
Λυοφιλοποιημένα ενθυλακωμένα κύτταρα	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Κατάλληλα για όλους τους τύπους των κυττάρων (όλα τα μεγέθη) ➤ Τα κύτταρα προστατεύονται σε ένα θρεπτικό περίβλημα έναντι μηχανικών και περιβαλλοντικών καταπονήσεων καθώς επίσης και εναντίον ανταγωνιστικών ειδών ➤ Αργή και ελεγχόμενη απελευθέρωση των μικροοργανισμών όταν το περίβλημα αποικοδομηθεί, ➤ Μεγάλη ποικιλία πολυμερών, μη-τοξικά, βιοδιασπώμενα ➤ Υψηλή συγκέντρωση κυττάρων → περιορισμένος χώρος αποθήκευσης ➤ Αποθήκευσης σε θερμοκρασία δωματίου (λυόφιλες κάψουλες) 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Υψηλό κόστος παραγωγής ➤ Μια σειρά σύνθετων βιομηχανικών διαδικασιών ➤ Ανάγκη ειδικού εξοπλισμού ➤ Υψηλό κόστος παραγωγής ➤ Μια σειρά σύνθετων βιομηχανικών διεργασιών ➤ Ανάγκη για ειδικό εξοπλισμό ➤ Φυσιολογικές, μορφολογικές και μεταβολικές αλλαγές που συμβαίνουν στα περιβλήματα ➤ Απαιτούνται πολλαπλές εφαρμογές αν τα στελέχη δεν μπορούν να εγκατασταθούν στο έδαφος. ➤ Δεν υπάρχουν διαθέσιμα εμπορικά προϊόντα

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΙΠΑΣΜΑΤΩΝ

Η εμβολιασμένη τύρφη συνήθως εφαρμόζεται στο πεδίο πριν από τη διαδικασία της σποράς απ'ευθείας στους σπόρους. Η απαιτούμενη ποσότητα του προϊόντος είναι σχετικά μικρό. Ωστόσο, ο έλεγχος των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται για έναν σπόρο είναι δύσκολος επειδή αυτοί είναι σε άμεση επαφή και με τις άλλες χημικές ουσίες με τις οποίες είναι επικαλυμμένοι οι σπόροι. Η επικάλυψη των σπόρων μπορεί να διεξαχθεί με μηχανήματα (αναμικτήρες τσιμέντου και μηχανοκίνητα μηχανήματα ανάμιξης). Αυτή η διαδικασία επιτρέπει τον εμβολιασμό ενός μεγάλου αριθμού σπόρων. Το κύριο μειονέκτημα της τύρφης πηγάζει από τη μεταβλητότητα στην ποιότητα και τη σύνθεσή της, οι οποίες εξαρτώνται από την πηγή. Η τύρφη είναι απροσδιόριστο και περίπλοκο υλικό ως προς τη σύνθεσή του, και πικίλλει σύμφωνα με την πηγή του, τη δυνατότητα να υποστηρίξει την ανάπτυξη και την επιβίωση των κυττάρων. Οι τοξικές ενώσεις μπορούν επίσης να απελευθερωθούν κατά τη διάρκεια της αποστείρωσης, πράγμα που επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη και τις πιθανότητες επιβίωσης των επιθυμητών μικροοργανισμών. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε προκλήσεις στη διασφάλιση της ποιότητας και των αποτελεσμάτων επί του εδάφους, καθώς και κατά τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών για την αποθήκευση ή την παρασκευή των οδηγιών χρήσης. Παρά τους περιορισμούς αυτούς, η τύρφη παραμένει το πρότυπο με το οποίο αξιολογείται οποιοδήποτε άλλο υλικό.

Ο άνθρακας, ο πηλός, και τα ανόργανα εδάφη (δηλ τα ηφαιστειακά λιθάρια (lapilli), η ηφαιστειακή ελαφρόπετρα ή η γη διατόμων) είναι διαθέσιμα σε διάφορες περιοχές και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς. Το ποσό των εμβολιασμένων μικροοργανισμών σε αυτά εξαρτάται από τον τόπο προέλευσης (περίπου 10² -10³ CFU g⁻¹), αλλά είναι γενικά χαμηλότερη σε σύγκριση με τα οργανικά μέσα. Ο βερμικουλίτης, ο περλίτης και ο μπεντονίτης είναι επίσης διαθέσιμα στις περισσότερες χώρες, αλλά η χρήση τους είναι γενικά περιορισμένη λόγω της δυσκολίας στην παρασκευή αποτελεσματικής φόρμουλας. Στην πραγματικότητα, η επίδραση αυτών των μέσων στη βιωσιμότητα και την ανάπτυξη των βακτηριδίων εξαρτάται από το pH, την ιοντική ισχύ και τον ηλεκτρολύτη στο διάλυμα. Η διογκωμένη άργιλος έχει ελεγχθεί ως φορέα για ΔΜΜ. Οι ρίζες μυκόριζας αναμειγμένες με χώμα, χρησιμοποιούνται επίσης για εμβολιασμούς ΔΜΜ. Μεταξύ των άλλων ανόργανων ενώσεων, οι γυάλινες χάντρες έχουν επίσης προταθεί για τον εμβολιασμό ΔΜΜ. Ένα μίγμα οργανικών και ανόργανων συστατικών αυξάνει με επιτυχία τη δραστηριότητα και τη διάρκεια ζωής της *Burkholderia sp.* Η δυνατότητα εφαρμογής της πλειονότητα των παραπάνω αναφερθέντων φορέων εξαρτάται από τη δυνατότητα απορρόφησης των μικροοργανισμών από την ουσία / τη μήτρα του φορέα. Αυτή η στρατηγική ενσωμάτωσης έχει κάποια μειονεκτήματα, ιδίως όσον αφορά την επιβίωση των μικροοργανισμών και την προστασία τους κατά τη μεταφορά, την αποθήκευση και το χειρισμό. Ωστόσο, έχει κατοχυρωθεί με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας μερικές διαδικασίες με διαφορετικά μέσα που χρησιμοποιούν παρόμοια προσέγγιση:

(I) Βελγικό Δίπλωμα Ευρεσιτεχνίας No.521.850 για τη χρήση της γης διατομών και του κολλοειδούς διοξειδίου του πυριτίου για *Rhizobium*,

(Ii) Βρετανικό Δίπλωμα Ευρεσιτεχνίας No 1.777.077 για τη χρήση του μπεντονίτη για *Rhizobium*,

(III) Γαλλικό Δίπλωμα Ευρεσιτεχνίας No. 1.180.000 για τη χρήση χυμού, στον οποίο προστίθενται ουσίες με προσροφητική δράση, όπως κυτταρίνη, οστεάλευρα, καολίνη, ή

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΙΠΑΣΜΑΤΩΝ

διοξειδίο του πυριτίου, στην κατασκευή παρασκευασμάτων που είναι πλούσια σε βακτηρίδια από την ομάδα *Azotobacter*,

(Iv) Δίπλωμα Ευρεσιτεχνίας των ΗΠΑ No.4956295 για τη σταθεροποίηση αποξηραμένων βακτηριδίων, διεσπαρμένων σε κονιοποιημένους φορείς, ενώ τα αποξηραμένα βιώσιμα βακτηρίδια αναμιγνύονται με ένα κονιοποιημένο φορέα που αποτελείται κυρίως από ανόργανο άλας με χαμηλή υγρασία, μαζί με μικρό τμήμα γέλης διοξειδίου του πυριτίου. Τα ανόργανα άλατα μπορεί να είναι ανθρακικά άλατα του νατρίου ή του ασβεστίου, όξινα ανθρακικά άλατα, θειικά ή φωσφορικά άλατα.

Κόκκοι

Για να ξεπεραστούν τα μειονεκτήματα της τύρφης, το ενδιαφέρον για άλλους τύπους σκευασμάτων αυξάνεται, ιδιαίτερα για τα κοκκώδη εμβόλια. Οι κόκκοι παράγονται από σφαιρίδια τύρφης ή μικρές μπάλες, χάντρες ασβεστίου ή διοξειδίο του πυριτίου, που χύνονται με ένα συγκολλητικό υλικό και στη συνέχεια αναμιγνύονται με κονιοποιημένο εμβόλιο. Έτσι τα σφαιρίδια επικαλύπτεται. Με αυτόν τον τρόπο οι κόκκοι σκεπάζονται ή εμποτίζονται με το απαιτούμενο μικροοργανισμό (-ούς). Το μέγεθος του κόκκου ποικίλει, αλλά η σχέση μεταξύ της αρχικής πυκνότητας του μικροβιακού πληθυσμού και της ποιότητας του τελικού προϊόντος είναι άμεση: όσο καλύτερος είναι ο αρχικός μικροβιακό πληθυσμός, τόσο καλύτερο είναι το προϊόν. Οι κόκκοι έχουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με την τύρφη. Είναι λιγότερο σκονισμένοι, πιο εύκολοι για τη χρήση και την αποθήκευση. Ο τόπος και η διαδικασία εφαρμογής μπορεί να ελεγχθεί εύκολα και η δυσκολία στην ενσωμάτωση των σπόρων ξεπερνιούνται: το ενοφθαλμισμα ψεκάζεται στην αύλακα κοντά στους σπόρος, προκειμένου να διευκολυνθούν οι αλληλεπιδράσεις με τις πλάγιες ρίζες, αλλά δεν βρίσκεται σε άμεση επαφή με τις χημικές ουσίες ή τα δυνητικώς τοξικά φυτοφάρμακα. Η χρήση σφαιριδίων περιορίζεται από το γεγονός ότι είναι πιο ογκώδεις και το κόστος μεταφοράς και αποθήκευσης είναι υψηλότερο.

Η πιο συχνή χρήση των κοκκώδων ενοφθαλμισμάτων των *Rhizobia*, αντί της τύρφης ή των υγρών ενοφθαλμισμάτων, έχει αξιολογηθεί σε αρκετές επιστημονικές μελέτες, με αποτελέσματα που ποικίλλουν. Αρκετές εκθέσεις ανασκόπησης καταδεικνύουν ότι η εφαρμογή των *Rhizobia* υπο τη μορφή κόκκων δεν αυξάνει τον σχηματισμό οξειδίων ή τη δέσμευση του N₂ σε σύγκριση με τα άλλα σκευάσματα (τύρφη και επικάλυψη των σπόρων). Άλλες μελέτες για τον εμβολιασμό ψυχανθών δείχνουν ότι τα κοκκώδη σκευάσματα είναι καλύτερα από τα προϊόντα που βασίζονται σε εμβόλια τύρφης και υγρά εμβόλια ως προς τον αριθμό και το βάρος των οξειδίων που σχηματίζεται, τη συσσώρευση N, τη δέσμευση του N₂ (% Ndfa) και τη συνολική παραγωγή βιομάζας. Τα οφέλη από τη χρήση κοκκώδων εμβολίων είναι ιδιαίτερα εμφανή σε εδάφη με έντονες συνθήκες εξωτερικού στρες, όπως υψηλή οξύτητα, υγρασία, ή χαμηλή θερμοκρασία.

Υγρά εμβόλια

Τα υγρά εμβόλια βασίζονται σε υδατικό μέσο, ανόργανα ή οργανικά έλαια, εναιωρήματα νερού-ελαίου ή εναιωρήματα πολυμερών. Τα προϊόντα αυτά είναι εύκολο στη χρήση τόσο πάνω σε σπόρους, όσο και στην άμεση εφαρμογή στο έδαφος, πράγμα που οδηγεί

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΙΠΑΣΜΑΤΩΝ

στην ευρεία διάδοση τους κατά την τελευταία δεκαετία. Λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων κυττάρων, χρησιμοποιούνται συχνά για την εμβολιασμό των οσπρίων (στις Ηνωμένες Πολιτείες και στον Καναδά, για παράδειγμα). Αυτό το χαρακτηριστικό επιτρέπει την εφαρμογή μικρότερης ποσότητας εμβολίου χωρίς να μεταβάλλεται η συνολική απόδοση. Ωστόσο, μια σειρά περιορισμών μειώνει τη χρήση τους: τα εμβόλια που βασίζονται σε υγρές καλλιέργειες δεν έχουν την προστασία από τον φορέα και χάνουν ταχέως τη βιωσιμότητα στο σπόρο. Απαιτούν ειδικές συνθήκες φύλαξης (χαμηλές θερμοκρασίες) και γενικά έχουν περιορισμένη διάρκεια ζωής. Επίσης τα υγρά εμβόλια είναι πιο ευαίσθητα σε στρες από το περιβάλλον και επιβιώσει δύσκολα στο μέσο. Η εφαρμογή ορισμένων άλλων συστατικών (σακχαρόζη, γλυκερόλη, αραβικό κόμμι, PVP) μπορεί να βελτιώσει την επιβίωση των μικροοργανισμών στα υγρά εμβόλια.

Μέσα που βασίζονται σε πολυμερή (κυτταρική ακινητοποίηση)

Η πρόοδος στα σκευάσματα οδηγεί σε νέες μεθόδους για την ακινητοποίηση των μικροοργανισμών που φαίνονται ιδιαίτερα ελπιδοφόρες. Η διαδικασία της ακινητοποίησης καλύπτει διάφορες μορφές σύνδεσης του κυττάρου με μία μήτρα. Εδώ περιλαμβάνονται η κροκίδωση, η προσρόφηση πάνω σε επιφάνειες, η ομοιοπολική σύνδεση με φορείς, διασταυρούμενη σύνδεση των κυττάρων, και ενθυλάκωση σε ένα πολυμερές πήκτωμα. Η ενθυλάκωση έχει αποδειχθεί ότι είναι η πιο πολλά υποσχόμενη τεχνική για την ανάπτυξη βακτηριακών φορέων. Μόλις ενθυλακωθούν, τα ζωντανά κύτταρα προστατεύονται σε περιβάλλον τροφίμων (ή κάψουλα) έναντι μηχανικού και περιβαλλοντικού στρες (π.χ., pH, θερμοκρασία, οργανικός διαλύτης, ή τοξίνη) καθώς και εναντίον ανταγωνιστικών ειδών. Όταν ενσωματωθούν στο χώμα, οι μικροοργανισμοί του εδάφους διασπούν αργά τις κάψουλες και σταδιακά απελευθερώνονται σε μεγάλες ποσότητες. Τυπικά, αυτό συμβαίνει κατά τη διάρκεια της βλάστησης των σπόρων ή των δενδρυλλίων. Διάφοροι τύποι κυττάρων μπορούν να ενθυλακωθούν, συμπεριλαμβανομένων των βακτηριδίων, των σπορίων των μυκήτων, ή των μικρών τμήματα υφών. Με αυτόν τον τρόπο, η διαδικασία της ενθυλάκωσης αποτελεί μια πολύ υποσχόμενη τεχνολογία για την ανάπτυξη προϊόντων ενός συστατικού ή πολλαπλών συστατικών, όπως βακτήρια που διαλύουν το φώσφορο - ΔΜΜ ή προϊόντα που βασίζονται σε *Rhizobia* - ΔΜΜ.

Διάφοροι τύποι πολυμερών μπορούν να χρησιμοποιούνται για ενθυλάκωση: φυσικά (πολυσακχαρίτες, πρωτεϊνούχο υλικό) ή συνθετικά υλικά (πολυακρυλαμίδιο, πολυουρεθάνη) και ομο-, έτερο- ή συμπολυμερή. Υπάρχουν πάνω από 1350 δυνατοί συνδυασμοί πολυμερών που μπορούν να εφαρμοστούν για ενθυλάκωση. Η επιλογή συνήθως βασίζεται στην χημική τους σύνθεση, το μοριακό βάρος τους (πολύ χαμηλό ή πολύ υψηλό μοριακό βάρος θεωρείται ως ελάττωμα), και στην ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με άλλα συστατικά. Το πολυακρυλαμίδιο και το αλγινικό είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα πολυμερή για την ενθυλάκωση κυττάρων. Το αλγινικό είναι το πιο συχνά προτιμώμενο πολυμερές επειδή το πολυακρυλαμίδιο απαιτεί πιο ειδικές συνθήκες για την επεξεργασία λόγω της τοξικότητάς του. Το αλγινικό είναι ένα φυσικό, βιοδιασπώμενο και μη τοξικό υπόστρωμα, το οποίο σχηματίζει ένα τρισδιάστατο πορώδες πήκτωμα όταν αναμιγνύεται με τα πολυσθενή κατιόντα (Ca^{2+}). Για το σχηματισμό των κόκκων, τα βακτηριακά κύτταρα διασπείρονται σε μια μήτρα πολυμερούς

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΙΠΑΣΜΑΤΩΝ

που χυτεύεται μέσα σε ένα κατιονικό διάλυμα. Οι θρεπτικές ουσίες και άλλα πρόσθετα μπορούν να συμπεριληφθούν για να παραταθεί η διάρκεια ζωής και να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα του εμβολίου. Οι κόκκοι περνούν από διαδικασία ξήρανσης για την περαιτέρω διευκόλυνση της συσκευασίας και τη χρήση. Διάφορες τεχνολογίες που εφαρμόζονται (συμπεριλαμβανομένης της ξήρανσης με ψεκασμό, εξώθηση, τεχνική γαλακτώματος, συσσωμάτωση, εκχύλιση με διαλύτη / εξάτμιση, θερμική ζελατινοποίηση, διάλυση προ-γέλης), για να ελέγχεται το μέγεθος, το σχήμα και η υφή των σφαιριδίων. Οι μικροί κόκκοι του 10-100 μm (μικρο-ενθυλάκωση) προτιμώνται, επειδή παρέχουν μία άμεση επαφή με τους σπόρους, ενώ η μικρο-ενθυλάκωση (χάντρες μεγαλύτερου μεγέθους που εκτείνεται από μερικά χιλιοστά έως εκατοστά) προϋποθέτει ότι τα αποδεσμευμένα κύτταρα θα κινούνται μέσω του εδάφους προς το φυτό.

Η ενσωμάτωση των βακτηρίων σε σφαιρίδια αλγινικού χρησιμοποιείται για διαφορετικούς τύπους, ανεξάρτητα αν σχηματίζουν σπόρια ή όχι. Πολλοί τύποι ΔΜΜ μπορούν επίσης να ενθυλακωθούν σε αλγινικές μήτρες ή σε σφαιρίδια που παρασκευάζονται με διαφορετικά πολυμερή. Τα σπόρια των μυκορριζικών μυκήτων ενσωματώνονται σε αλγινικό στρώμα αποτελούμενο από κόσκινο υαλοβάμβακα με επικάλυψη PVC. Οι ρίζες δενδρυλλίων πράσων, που εμβολιάστηκαν με αυτό το στρώμα αλγινικού το οποίο περιέχει σπόρια του *G. mosseae*, αποικίστηκαν ευρέως μετά από αρκετές εβδομάδες ανάπτυξης σε συνθήκες θερμοκηπίου. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν με σπόρια που προέρχονται από μονοξενικές καλλιέργειες ενσωματωμένες σε κόκκους. Η ένταξη νηματοειδών μικροοργανισμών, όπως *Aspergillus* και *Actinomyces* και ακτινομύκητες είναι επίσης δυνατή.

Αρκετές θετικές επιπτώσεις στα ελεύθερα κύτταρα (συνηθισμένες συνθέσεις) έχουν αναφερθεί κατά τη χρήση αυτής της προσέγγισης. Εκτός από την προστασία των κυττάρων που παρέχονται από το κέλυφος, διάφορες μελέτες σε πολλαπλές συνθήκες δείχνουν ότι η ενθυλάκωση έχει πολυάριθμα πλεονεκτήματα κατά την αποθήκευση και τη χρήση στο πεδίο. Αυτή η διαδικασία δε δημιουργεί στρες για τα κύτταρα, οι ασηπτικές συνθήκες ελαχιστοποιούν τη μόλυνση και οι φορείς είναι βιοδιασπώμενοι και μη τοξικοί. Καθώς οι κόκκοι μπορούν να έχουν υψηλό βαθμό συγκέντρωσης, ο όγκος τους είναι μικρός και ως εκ τούτου, είναι αναγκαίος περιορισμένος χώρος για αποθήκευση και μεταφορά. Έχουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, μπορούν ακόμη και να αποθηκεύονται αποξηραμένοι σε θερμοκρασία δωματίου για ένα σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα, είναι εύκολοι στη χρήση και με σταθερή ποιότητα. Όταν τα κύτταρα είναι ενθυλακωμένα, κατανέμονται ομοιόμορφα στη θέση στόχο, ακόμη και πάνω σε μικρούς σπόρους και εξασφαλίζεται αποτελεσματική εφαρμογή. Ως αποτέλεσμα, η κίνηση των κυττάρων μέσω του εδάφους και η ικανότητά τους να μεταναστεύουν έξω από την οριοθετημένη περιοχή μειώνεται σημαντικά. Έχει αποδειχθεί επίσης ότι η ενθυλάκωση των βακτηρίων που διαλύουν τον φώσφορο αυξάνει την ικανότητά τους να διαλύουν τον P και το δυναμικό για τη διέγερση της ανάπτυξης των φυτών σε σύγκριση με τα ελεύθερα κύτταρα. Οι περιορισμοί περιλαμβάνουν υψηλό κόστος παραγωγής, περίπλοκη διαδικασία χειρισμού σε βιομηχανικό επίπεδο, και απαιτήσεις για ειδικό εξοπλισμό.

Εξάλλου, μπορεί να προκληθούν φυσιολογικές, μορφολογικές και μεταβολικές μεταβολές σε καψουλωμένα κύτταρα, πράγμα που συνεπάγεται την ανάγκη επανειλημμένων εφαρμογών των κόκκων.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΙΠΑΣΜΑΤΩΝ

Παρά το γεγονός ότι η καψυλίωση φαίνεται να έχει σχετική επιτυχία, το μεγαλύτερο μέρος των ερευνών έχουν διεξαχθεί σε εργαστηριακές συνθήκες και μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κανένα εμπορικό προϊόν που να διατίθεται στην αγορά. Οι υψηλές παραγωγικές δαπάνες και η τεχνική επεξεργασία μπορούν να αποδειχθούν μια από τις εξηγήσεις για την μη αποδοχή της τεχνολογίας από την βιομηχανία. Οι νέες τεχνολογίες πρέπει να παραμείνουν προσιτές και αποτελεσματικές όσον αφορά τις δαπάνες, προκειμένου να εφαρμόζονται εύκολα από τους παραγωγούς και τους γεωργούς.

Η μείωση του κόστους παραγωγής και η βελτίωση της ποιότητας των σφαιριδίων μπορεί να επιτευχθεί μέσω της ενθυλάκωσης και ξήρανσης στον αέρα του βακτηριακού μείγματος που παρασκευάζεται από αλγινικό (3%), τυποποιημένο άμυλο (44,6%), και τροποποιημένο άμυλο (2,4%). Αυτή η διαδικασία επιτρέπει στις σφαιρίδια μετά από ξήρανση να έχουν 7% περιεκτικότητα σε νερό, μέγεθος των 4 mm και μηχανική αντοχή σε περίπου 105 N (χαρακτηριστικά που είναι όμοια με εκείνα των σπόρων των δημητριακών). Τα ενθυλακωμένα βακτήρια μπορούν να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου ή σε 4°C χωρίς να χάνουν τη βιωσιμότητά τους - είναι σε θέση να επιβιώσουν μέχρι έξι μήνες με μέγεθος πληθυσμού περίπου 10^8 CFU g^{-1} (που αντιστοιχεί σε περίπου 10^5 CFU σφαιρίδιο⁻¹). Ωστόσο, σε αυτή τη σύνθεση, μπορούν να προκύψουν κάποια προβλήματα, όταν τυποποιηθεί και να αυτοματοποιηθεί η παραγωγή των σφαιριδίων εξαιτίας της ιξώδους του μίγματος και της ανάγκης για συνεχή ανάδευση του αρχικού μέσου. Πρόσφατα προτάθηκε μια νέα διαδικασία που χρησιμοποιεί λύματα από τη βιομηχανία αμύλου, ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή των *Sinorhizobium meliloti* με ταυτόχρονη προσθήκη αλγινικού, και σογιέλαιο ως γαλακτωματοποιητής. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν δείχνουν μία κυτταρική βιωσιμότητα μεγαλύτερη από 10^9 CFU mL^{-1} μετά από 9 εβδομάδες αποθήκευσης. Η προσθήκη συνθετικού ζεολίθου στο μίγμα του αλγινικού δεν βελτιώνει την επιβίωση των ενσωματωμένων μικροβιακών κυττάρων, ούτε την φυσική δομή των σφαιριδίων.

Διάφορα άλλα πολυμερή έχουν επίσης δοκιμαστεί με ΔΜΜ. Η καρραγενάνη χρησιμοποιείται για την ενθυλάκωση των ΔΜΜ, ενώ η υδροξυαιθυλοκυτταρίνη χρησιμοποιείται ως φορέας γέλης. Έχουν καταχωρηθεί δύο διπλώματα ευρεσιτεχνίας:

(i) Γαλλική αίτηση ευρεσιτεχνίας αρ. 77,10254 (αντιστοιχεί στο US δίπλωμα ευρεσιτεχνίας αρ. 4.155.737), η οποία επιτρέπει τη χρήση γέλης πολυμερούς με βάση πολυακρυλαμίδιου ή γέλης διοξειδίου του πυριτίου για διάφορους μικροοργανισμούς,

(ii) Δίπλωμα ευρεσιτεχνίας των ΗΠΑ αρ. 5021350 για τη μέθοδο της ενσωμάτωσης μυκοριζικών και ακτινοριζικών μικροοργανισμών σε μια μήτρα πολυμερικής γέλης που βασίζεται σε τουλάχιστον ένα πολυμερές από την ομάδα των πολυσακχαριτών, με τουλάχιστον μερική εγκάρσια σύνδεση του πολυμερούς.

Άλλα μέσα

Ευρύ φάσμα υλικών, τόσο φυσικών όσο και συνθετικών, έχουν δοκιμαστεί και αξιολογηθεί ως εναλλακτικούς φορείς για διάφορους μικροοργανισμούς. Οι κύριοι παράγοντες για τη χρήση άλλων τύπων μέσων αποδείχθηκαν η διαθεσιμότητα και η τιμή τους, και όχι οι απαιτήσεις για τη βελτίωση της ποιότητας και την ευρύτερη διανομή.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΙΠΑΣΜΑΤΩΝ

Έχουν προταθεί αρκετές φθινές οργανικές μήτρες, συμπεριλαμβανομένων των ιδατικών ιζημάτων, κομποστοποιημένων λιπασμάτων, ροκανιδίων, ζαχαροκάλαμου, ορού γάλακτος ή εμπλουτισμένων αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων. Η ιλύς από τα λύματα μπορεί να είναι ένας κατάλληλος φορέας, αλλά περιέχει βαρέα μέταλλα και δημιουργεί ένα νομικό ζήτημα σχετικά με τη χρήση της. Μια καλή εναλλακτική λύση για την τύρφη είναι το βιομηχανικό κομπόστ της βιομηχανίας φελλού. Υποστηρίζει καλά την επιβίωση των διαφόρων βακτηρίων ριζόσφαιρας για περίοδο αποθήκευσης των έξι μηνών, και την επιβίωσή τους πάνω στους σπόρους. Ωστόσο, το οργανικό κομπόστ δεν είναι εφαρμόσιμο σε σκευάσματα με ΔΜΜ, καθώς μπορεί να μειώσει την ταχύτητα σχηματισμού μυκόριζας.

Ο άνθρακας, ο πηλός, και τα ανόργανα εδάφη (πέτρες, βράχοι, ηφαιστειακή ελαφρόπετρα, ή γη διατόμων) μπορούν να χρησιμοποιηθούν όπου είναι διαθέσιμες, αλλά η μικροβιακή συγκέντρωση είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με τα οργανικά μέσα. Στη Μαδαγασκάρη, η παραγωγή ΔΜΜ πραγματοποιείται με τη χρήση ενός ειδικού ηφαιστειακού πετρώματος. Η χρήση περλίτη ως φορέας συχνά δίνει μεταβλητά αποτελέσματα. Είναι κατάλληλος, αλλά λιγότερο αποτελεσματικός από τον φελλό και την τύρφη. Η αποτελεσματικότητά του αυξάνεται όταν χρησιμοποιείται σακχαρόζη ως συνδετική ύλη.

Οι γέλες από διάφορες χημικές ενώσεις (συμπεριλαμβανομένου του πυριτικού μαγνησίου ή ενός πηκτώματος που βασίζεται στην κυτταρίνη) θεωρούνται ως πιθανούς υποψήφιους, αλλά καμία από αυτές δεν έχει χρησιμοποιηθεί στα αγροκτίματα.

Οι υποσχόμενες νέες τεχνολογίες για την ανάπτυξη των μέσων

Τα γαλακτώματα νερού-ελαίου φαίνονται να είναι μια ελκυστική, αλλά αχρησιμοποίητη μέθοδος για την αποθήκευση και παράδοση των μικροοργανισμών μέσω υγρών σκευασμάτων. Το έλαιο πιάνει το νερό γύρω από τον οργανισμό, ενώ αντίστοιχα επιβραδύνει την εξάτμιση του νερού. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό όταν χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί που ευαίσθητοι στην ξήρανση, ή κηπευτικές καλλιέργειες, όπου δεν εδιαθέσιμα συστήματα άρδευσης. Τα γαλακτώματα νερού-ελαίου επιτρέπουν την προσθήκη υποστρωμάτων στο έλαιο ή / και στην υδατική φάση. Με αυτόν τον τρόπο βελτιώνουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων και την κινητική απελευθέρωση. Ωστόσο, η κυτταρική καθίζηση είναι ένα σημαντικό ζήτημα που πρέπει να ληφθεί υπόψη. Μια σειρά από μελέτες έχουν προσπαθήσει να λύσουν αυτό το πρόβλημα με τη χρήση νανοϋλικών. Η αύξηση της ελαιώδους φάσης με τη χρήση υδρόφοβων νανοσωματιδίων πυριτίας αφαιρεί πουασιατικά την καθίζηση των κυττάρων και αυξάνει την βιωσιμότητα κατά την αποθήκευση.

Πρόσφατα προτάθηκε μια νέα διαδικασία για την ενθυλάκωση ικών παρασκευασμάτων που βασίζεται στην εφαρμογή των ιδιοτήτων των υπερκρίσιμων ρευστών. Η ίδια ιδέα μπορεί να εφαρμοστεί στην παρασκευή βακτηριακού εμβολίου. Η διαδικασία που ονομάζεται «Σωματίδια από διαλύματα κορεσμένα με αέριο» (ΣΔΚΑ) διεξάγεται σε χαμηλές θερμοκρασίες χρησιμοποιώντας διοξείδιο του άνθρακα ως υπερκρίσιμο ρευστό.

Τα κύρια πλεονεκτήματα της προτεινόμενης τεχνικής είναι η απουσία αρνητικής επίδρασης στην βιωσιμότητα των μικροοργανισμών και το χαμηλό κόστος παραγωγής. Το τελικό προϊόν της διαδικασίας είναι σχεδόν σφαιρικά σωματίδια τα οποία σχηματίζουν μια

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΙΠΑΣΜΑΤΩΝ

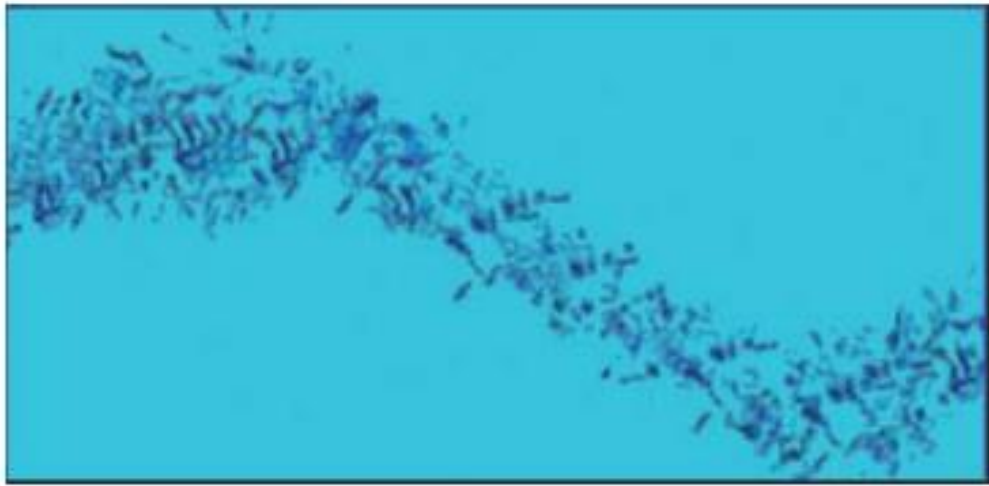
ελεύθερα ρέουσα σκόνη που μπορεί να εναιωρείται σε νερό. Οι δυνατότητες της διαδικασίας ΣΔΚΑ έχουν ήδη αποδειχθεί με επιτυχία για μερικές στερεές ουσίες και υγρά.

Μια άλλη ενδιαφέρουσα καινοτομία είναι η χρήση της φυσικής διαμόρφωσης βακτηριακών βιοφίλμ ως ένας πιθανός φορέας. Μπορούν να εφαρμόζονται όχι μόνο για την παραγωγή του βακτηριακού εμβολίου αλλά και για μυκητο-βακτηριακές κοινότητες. Οι βιομεμβράνες χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία για διάφορες εφαρμογές (π.χ., για την επεξεργασία των λυμάτων, την παραγωγή χημικών ενώσεων). Λαμβάνονται υπόψη δύο τύποι βιοφίλμ: βιοφίλμ που αναπτύσσονται πάνω σε αδρανή μέσα (άνθρακας, ρητίνη, σκυρόδεμα, πηλός, τούβλα και σωματίδια άμμου) και βιομεμβράνες που σχηματίζονται ως αποτέλεσμα του σχηματισμού ενός συσσωματώματος. Στην πρώτη περίπτωση, οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται παντού γύρω από τα σωματίδια και το μέγεθος των βιοφίλμ αυξάνεται με το χρόνο - συνήθως έως μερικά χιλιοστά σε διάμετρο. Οι βιομεμβράνες που σχηματίζονται μέσω συσσωμάτωσης ονομάζονται κοκκώδη βιοφίλμ και ο σχηματισμός τους μπορεί να διαρκέσει από μερικές εβδομάδες έως μήνες.

Υπάρχουν τέσσερα στάδια ανάπτυξης ενός ώριμου βιοφίλμ: I) η αρχική σύνδεση, II) μη αναστρέψιμη σύνδεση, III) πρόωμη ανάπτυξη και IV) ωρίμανση. Ιδιαίτερα κρίσιμη είναι η μη αναστρέψιμη σύνδεση όταν τα κύτταρα στερεώνονται στην επιφάνεια και συνθέτουν εξωκυτταρικά πολυμερικά υποστρώματα (ΕΠΥ). Έτσι, οι μικροοργανισμοί που προστατεύονται από το περιβάλλον. Τα εξωκυτταρικά πολυμερικά υποστρώματα συνήθως σχηματίζονται από πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, ή φωσφολιπίδια. Ένα τυπικό ΕΠΥ που ελευθερώνεται από βακτηριακά κύτταρα σε βιομεμβράνες είναι ο αλγινικός πολυσακχαρίτης (Εικ. 4 και 5).

Η ταχύτητα σχηματισμού των βιοφίλμ επηρεάζεται κυρίως από τις επιφάνειες, και από κυτταρικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ανώμαλες επιφάνειες, πορώδη και λιγότερο υδρόφοβα υλικά έχουν την τάση να προάγουν το σχηματισμό βιοφίλμ. Τα τελευταία σχηματίζονται πιο εύκολα υπό την παρουσία ενός βέλτιστου θρεπτικού περιβάλλοντος, ιδίως με την παρουσία φωσφόρου, η οποία αυξάνει την ικανότητα προσκόλλησης των κυττάρων. Άλλοι παράγοντες που επιδρούν θετικά στον σχηματισμό βιοφίλμ είναι η υψηλή θερμοκρασία, η σύνθεση εξωκυτταρικών πολυμερικών υποστρωμάτων, και προσκόλληση στην επιφάνεια. Οι βιοαντιδραστήρες για την παραγωγή βιοφίλμ μπορούν να συναρμολογηθούν σε έναν αριθμό διαμορφώσεων, συμπεριλαμβανομένων των αντιδραστήρων για περιοδική καλλιέργεια, με δεξαμενή συνεχούς ανάδευσης, ρευστοποιημένη κλίση, αντιδραστήρων ανύψωσης αέρα (air-lift) κ.λπ.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΙΠΑΣΜΑΤΩΝ



Εικ. 4. Μυκητο-βακτηριακό βιοφίλμ (MBB)



Εικ. 5. Μυκητο-ριζοβιακό βιοφίλμ (MPB) ρίζας σίτου.

Τελευταία, με καλή πρακτική αποτελεσματικότητα, χρησιμοποιούνται βιοφίλμ που παράγονται σε *in vitro* καλλιέργειες που περιέχουν τόσο μυκητικά όσο και βακτηριακά στελέχη. Η εφαρμογή ενός μυκητο-ριζοβιακού βιοφίλμ οδηγεί σε σημαντική αύξηση της δέσμευσης N₂ στη σόγια, σε σύγκριση με το συμβατικό εμβόλιο που περιέχει μόνο *Rhizobia*. Τα σπορόφυτα σίτου εμβολιασμένα με ένα βιοφίλμ που σχηματίζεται από βακτήρια εμφανίζουν αυξημένη απόδοση σε μετρίως αλατούχα εδάφη. Επιπλέον, τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι τα βιοφίλμ παρέχουν προστασία στους μικροοργανισμούς και εξασφαλίζουν την επιβίωσή τους, ακόμη και κάτω από συνθήκες στρες. Ένα από τα κύρια προβλήματα ζωτικής σημασίας είναι η αποτελεσματικότητα του εμβολιασμού PCPP σε γεωργικές συνθήκες. Έχει αποδειχθεί ότι ένα εμβόλιο υπό τη μορφή βιοφίλμ επιτρέπει στα στελέχη *Rhizobia* να επιβιώσουν σε υψηλή αλατότητα (400 mM NaCl) που είναι 10⁵ φορές μεγαλύτερη από ό,τι σε μονοκαλλιέργειες *Rhizobia*. Ένα ενδιαφέρον γεγονός είναι ότι τα

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΙΠΑΣΜΑΤΩΝ

ευεργετικά ενδόφυτα στις βιομεμβράνες εξασφαλίζουν μια πολύ υψηλότερη οξύτητα και τη σύνθεση ορμονών ανάπτυξης των φυτών σε σύγκριση με τις μονο- ή μικτές καλλιέργειες.

Ένας άλλος νέος ορίζοντας στην ανάπτυξη μέσω για PCPP είναι η παραγωγή υβριδικών υλικών για εμβολιασμό. Το πυρίτιο αποτελεί έναν πολυ υποσχόμενο ξενιστή για ενθυλάκωση: Η τεχνική βασίζεται στην διασπορά του βακτηριακού πληθυσμού σε πυριτική πηκτή και την ακινητοποίηση του. Το κύτταρο μπορεί να συλληφθεί είτε σε αλγινικά μικροσφαιρίδια, επικαλυμμένα με μεμβράνες από πυριτική πηκτή ή σε μακρο-κοιλότητες που δημιουργούνται μέσα στη μήτρα διοξειδίου πυριτίου. Τέτοια υβριδικά υλικά βελτιώνουν τις μηχανικές ιδιότητες των σφαιριδίων αλγινικού, μειώνουν τη διαρροή κυττάρων, και να αυξάνουν την κυτταρική βιωσιμότητα.

Η εφαρμογή των βιο-νανοτεχνολογιών μπορεί επίσης να παρέχει μια νέα κατεύθυνση για την ανάπτυξη φορέων βιολιπασμάτων. Τα νανοσωματίδια που παρασκευάζονται από ανόργανα ή οργανικά υλικά χρησιμοποιούνται στο μέγεθος των 100 nm ή μικρότερο. Η ενσωμάτωση ολόκληρων κυττάρων στα πλαίσια υβριδικών νανοδομών έχει πολυάριθμες εφαρμογές σε πολλούς τομείς, συμπεριλαμβανομένου του τομέα της γεωργίας. Από πρόσφατα παράγονται μακροσκοπικά φίλτρα, κατασκευασμένα από ακτινικά διατεταγμένους νανοσωλήνες άνθρακα που είναι καινούρια να απορροφούν τα *Escherichia coli*. Αυτή η τεχνολογία εφαρμόζεται για το διαχωρισμό των βακτηριακών κυττάρων από τις διεργασίες ζύμωσης και για την παράδοσή τους στα φυτά. Η φυσική σταθερότητα και η μεγάλο εμβαδού επιφάνεια των νανοσωλήνων, μαζί με το χαμηλό βάρος και την οικονομικά αποδοτική παραγωγή αυτών των μεμβρανών, μπορούν να εξασφαλίσουν μεγαλύτερη παραγωγή βιολιπασμάτων.

Η χρήση νανο-σκευασμάτων μπορεί να βελτιώσει τη σταθερότητα των βιολιπασμάτων και βιοδιεγερτικών από την άποψη της ξήρανσης, της θερμικής καταπόνησης και της υπεριώδους αδρανοποίησης. Η προσθήκη υδρόφοβων πυριτικών νανοσωματιδίων διαστάσεων 7-14 nm στη σύνθεση του γαλακτώματος νερού-ελαίου του μύκητα-βιοπαρασιτοκτόνου *Lagenidium giganteum* μειώνει την ξήρανση του μυκηλίου. Τα φυσικά χαρακτηριστικά του σκευάσματος έχουν βελτιωθεί και οι μικροοργανισμοί είναι βιώσιμοι και ενεργοί μετά από αποθήκευση για περίοδο 12 εβδομάδων σε θερμοκρασία δωματίου.

ΣΥΝΔΕΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Συχνά στην τύρφη προστίθενται συνδετικά μέσα για να εξασφαλιστεί η ομοιομορφία της στην επικάλυψη των σπόρων. Συσσωματικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στις παρούσες γεωργικές πρακτικές είναι διαφορετικά πολυμερή: πολυσακχαρίτες (όπως το αραβικό κόμμι ή η καρβοξυμεθυλκυτταρίνη), παράγωγα πολυαλκοολών ή καζεϊνικά άλατα. Σημαντικές προϋποθέσεις είναι:

- μη-τοξικές για τους σπόρους ή τους μικροοργανισμούς
- εύκολη διασπορά σε νερό
- προσφέρει καλύτερη πρόσφυση και επιβίωση των μικροοργανισμών πάνω στους σπόρους.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΙΠΑΣΜΑΤΩΝ

Χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό χάρη στην ικανότητά τους να διατηρούν τη βιωσιμότητα των *Rhizobia* και των σπόρων των ψυχανθών. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για τους ακριβείς μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την παροχή αυξημένης αξιοπιστίας από αυτά τα πολυμερή. Ένα σημαντικό μειονέκτημα είναι ότι όταν εφαρμόζονται μαζί με αντιδραστήρια σύζευξης, στο φλοιό των σπόρων εναποτίθεται μεγάλη ποσότητα τύρφης, η οποία οδηγεί σε μεγαλύτερο χρόνο επαφής μεταξύ των βακτηρίων και των τοξικών ενώσεων του φλοιού.

ΠΡΟΣΘΕΤΑ

Άλλες ουσίες που προστίθεται στη σύνθεση του εμβολίου περιλαμβάνουν μακρο- και μικροστοιχεία, πηγές άνθρακα ή ορυκτών, ορμόνες, και ακόμη και μυκητοκτόνα. Ο στόχος είναι να εξασφαλιστεί στους μικροοργανισμούς μια πηγή προστασίας ή / και τροφίμων, προκειμένου να διασφαλιστεί καλύτερη προσκόλληση στους σπόρους και με αυτόν τρόπο να βελτιωθεί η ποιότητα του εμβολίου, να γίνει το προϊόν πιο σταθερό, να απενεργοποιηθούν οι τοξίνες ή να βελτιωθεί η επιβίωση του στελεχούς (των στελεχών) μετά από έκθεση σε στρεσογόνες περιβαλλοντικές συνθήκες (υψηλή θερμοκρασία, ξήρανση). Υπάρχει μια κρίσιμη αναλογία μεταξύ της βιωσιμότητας των στελεχών και των πρόσθετων που χρησιμοποιούνται. Ορισμένα από αυτά (όπως η γλυκερόλη) βελτιώνουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων, προστατεύοντας τους μικροοργανισμούς από την ξήρανση μέσω της διατήρησης σημαντικών ποσοτήτων νερού. Έτσι, η ταχύτητα ξήρανσης μειώνεται σημαντικά. Κάθε πρόσθετη ύλη πρέπει να επιλεγεί για κάθε χωριστό στέλεχος προκειμένου να διασφαλιστεί η μέγιστη απόδοση. Επιπλέον, η χημική δομή τους πρέπει να επιτρέπει την αξιόπιστη και μακροπρόθεσμη σταθερότητα. Μερικά συστατικά έχουν δοκιμαστεί, όπως: άργιλος, αποβουτυρωμένο γάλα, ξανθάνη, ή αλγινικό νάτριο, με μεταβλητά αποτελέσματα της επιβίωσης του στελεχούς (των στελεχών) κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και της εφαρμογής. Επιπλέον, με την προσθήκη στο μέσο καλλιέργειας και στο εμβόλιο ορισμένων μορίων σηματοδότησης διαπιστώνεται μια επιθυμητή φυσιολογική δραστηριότητα των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται. Μια πρόσφατη έκθεση αναφέρει ότι ορισμένοι ριζοβιακοί μεταβολίτες αυξάνουν την αποτελεσματικότητα των *Bradyrhizobium spp.* και *Azospirillum brasilense*, όταν επεξεργάζεται η σόγια και το καλαμπόκι. Αυτοί οι μεταβολίτες περιλαμβάνουν κυρίως λιποχιτοολιγοσακχαρίτες (που στο εξής θα ονομάζονται παράγοντες Nod), αλλά επίσης εξωπολυσακχαρίτες και φυτικές ορμόνες. Έχει διαπιστωθεί ότι οι παράγοντες Nod συντίθενται από τα περισσότερα *Rhizobia* και είναι υποχρεωτικοί σε μολύνσεις της ρίζας των οσπρίων και στη δημιουργία οζιδίων. Απ'όσο γνωρίζουμε, η χρήση μορίων σηματοδότησης για την αύξηση της παραγωγικότητας των καλλιεργειών είναι ακόμη περιορισμένη. Ωστόσο, μερικές καλλιέργειες οσπρίων που περιέχουν υποκινητές σχηματισμού όζων (φλαβονοειδή ή παράγοντες Nod) διατίθενται στο εμπόριο στη Βόρεια και τη Νότια Αμερική. Τα διεγερτικά της μυκοριζικής συμβίωσης έχουν επίσης εντοπιστεί. Οι στριγολακτόνες αποτελούν επιστημονικό, θεμελιώδες και πρακτικό ενδιαφέρον, επειδή υποτίθεται ότι διαδραματίζουν καίριο ρόλο στη δημιουργία της μυκοριζικής συμβίωσης. Έχει αποδειχθεί ότι λειτουργούν ως ορμόνες στα φυτά, και μπορεί να παίζουν ρόλο στην προ-συμβιωτική ανάπτυξη των ΔΜΜ. Η

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΙΠΑΣΜΑΤΩΝ

εφαρμογή τους στις καλλιέργειες μπορεί να οδηγήσει σε μια θετική επίδραση στην ανάπτυξη των συμβιωτικών σχέσεων. Απαιτείται όμως περισσότερη έρευνα για να αξιολογηθεί κατάλληλα το δυναμικό τους ως διεγερτικά για την ανάπτυξη μιας νέας γενιάς μυκοριζικών εμβολίων.

ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ

Το υλικό της συσκευασίας είναι ένα άλλο σημαντικό ζήτημα που θα πρέπει να ληφθεί υπόψη κατά την παραγωγή λιπασμάτων, επειδή μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του εμβολίου. Το υλικό πρέπει να επιτρέπει την ανταλλαγή του οξυγόνου, αλλά να περιορίζει το πέρασμα του νερού. Πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στην επιλογή του υλικού για ένα προϊόν που πρόκειται να αποστειρωθεί. Μερικά συσκευασίες είναι κατάλληλες για αποστείρωση σε αυτόκλειστο, αλλά μπορούν να καταστραφούν κατά την έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία, και το αντίστροφο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Herrmann L & Lesueur D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97:8859–8873
2. Malus E, Sas-Paszt L, Ciesielska J. Technologies for Beneficial Microorganisms Inocula Used as Biofertilizers. *The Scientific World Journal*, 2012, Article ID 491206
3. Yadav AK, Chandra K. Mass Production and Quality Control of Microbial Inoculants. *Proc Indian Natn Sci Acad*, 2014, 80 (2): 483-489
4. Organic Farming: Organic Inputs and Techniques: http://agritech.tnau.ac.in/org_farm/orgfarm_biofertilizertechnology.html
5. Biofertilizer Manual by FNCA Biofertilizer, 2006, Japan Atomic Industrial Forum (JAIF)
6. Borkar SG. *Microbes as Biofertilizers and their Production Technology*, 2015, Woodhead Publishing India Pvt. Ltd.