

DOES POLYMER-BASED ENCAPSULATION ENHANCE PERFORMANCE OF PLANT GROWTH PROMOTING MICROORGANISMS? A META-ANALYSIS VIEW

¿MEJORA EL ENCAPSULAMIENTO BASADO EN POLÍMEROS EL DESEMPEÑO DE LOS MICROORGANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL? UNA VISIÓN DE META-ANÁLISIS

J. Alberto Pacheco-Aguirre, Esau Ruíz-Sánchez, H. Salomón Ballina-Gómez, C. Juan Alvarado-López

División de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Conkal, Tecnológico Nacional de México. 97345. Conkal, Yucatán, México. Avenida Tecnológico s/n. (horacio.ballina@itconkal.edu.mx).

ABSTRACT

Various studies have been undertaken to evaluate the effect of polymer-based encapsulation on performance of plant growth promoting microorganism. However there is no systematic analysis about the performance of these microorganisms when encapsulated in a polymer-based matrix. Relevant published papers were retrieved by conducting searches in Google Scholar, Only Library, Science Direct, Springer Journal, Taylor & Francis and Wiley Online Library. An examination of 117 articles was carried out and of those only 11 satisfied our criteria for inclusion into the meta-analysis. From these articles, we selected 41 cases to be evaluated. We used as keywords “microcapsules”, “capsules”, “microorganisms”, “growth”, “promoting”, “germination” “bacteria”, “plant”, “sodium alginate”, “antagonist” and “fungi”. We used sample size, means, standard deviations, F-test statistics, χ^2 and/or p-value. Also gum and hardener concentration, and type of microencapsulated agent, microorganism and plant species were manipulated as factors; and measures of leaf, shoot and root, and seed germination were taken as responses variables. A general trend of enhanced performance was observed for microorganisms examined (except *Trichoderma harzianum*), also among plant species a positive trend was observed in *Triticum* sp., *Vigna radiata* and *Gossypium* sp. Plant growth showed differential responses; positive on root mass and shoot length but no effects on seed germination. Analysis of hardener and gum concentrations revealed that polymers containing 2 % of both compounds are ideally suited to enhance plant growth promoting microorganisms (PGPM) performance. We highlight beneficial effect of

RESUMEN

Varios estudios se han realizado para evaluar el efecto de la encapsulación basada en polímeros sobre el rendimiento del crecimiento vegetal que promueva el desarrollo de microorganismos. Sin embargo, no hay una revisión sistemática sobre el rendimiento de estos microorganismos cuando se encapsulan en una matriz polimérica. Los artículos relevantes fueron recuperados mediante búsquedas en Google Scholar, Only Library, Science Direct, Springer Journal, Taylor & Francis y Wiley Online Library. Examinamos 117 artículos y solo 11 satisficieron nuestros criterios de inclusión en el metanálisis. De estos artículos, se seleccionaron 41 casos para evaluarse. Como palabras clave se utilizaron “microcápsulas”, “cápsulas”, “microorganismos”, “crecimiento”, “promoción”, “germinación”, “bacterias”, “planta”, “alginato sódico”, “antagonista” y “hongos”. Utilizamos el tamaño de la muestra, los medios, las desviaciones estándar, las estadísticas de la prueba F, el valor de χ^2 y/o p. También se manipularon como factores la concentración de goma y endurecedor, y el tipo de agente microencapsulado, microorganismos y especies vegetales; y las medidas de la hoja, el brote y la raíz, y la germinación de las semillas se tomaron como variables de respuesta. Una tendencia general de mayor rendimiento se observó para los microorganismos examinados (excepto *Trichoderma harzianum*); también entre las especies de plantas se observó una tendencia positiva en *Triticum* sp., *Vigna radiata* y *Gossypium* sp. El crecimiento de las plantas mostró diferentes respuestas; positivo en la masa de las raíces y en la longitud de los brotes, pero sin efectos en la germinación de las semillas. El análisis de las concentraciones de endurecedor y goma reveló que los polímeros que contienen 2 % de ambos compuestos son ideales para mejorar el rendimiento de los microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas (PGPM). Destacamos el efecto beneficioso de la bacteria *Bacillus subtilis* cuando

* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: October, 2015. Approved: November, 2016.

Published as ARTICLE in Agrobiencia 51: 173-187. 2017.

bacteria *Bacillus subtilis* when encapsulated in a polymeric gum. Positive effects of encapsulation for PGPM on plant root mass and shoot length were observed on *Triticum* sp., *V. radiata* and *Gossypium* sp. Hardener and gum concentrations of 2 % resulted in positive effects on plant growth promoting microorganism encapsulation performance.

Keyword: *Bacillus* sp., inoculant, microcapsules, plant growth, seed germination.

INTRODUCTION

There is an effort to use beneficial microorganisms to promote plant growth in order to reduce the intensive use of agrochemicals and to contribute to the expansion of sustainable agricultural practices (Vassilev *et al.*, 2001; Cappellari *et al.*, 2013). Three major groups of microorganisms are considered beneficial to plant growth: mycorrhizal fungi, free-living plant growth promoting fungi and plant growth-promoting rhizobacteria (Harman *et al.*, 2004; Malusá *et al.*, 2012). Mycorrhizal fungi include arbuscular mycorrhizae and ectomycorrhizae of multiple fungal clades such as Glomeromycota, Ascomycota, and Basidiomycota (Kuo *et al.*, 2014). Free-living plant growth-promoting fungi include species of the genera *Trichoderma*, *Aspergillus* and *Phoma* (Harman *et al.*, 2004; Salas, 2011). Plant growth promoting rhizobacteria comprise the genera *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Pseudomonas*, and some endophytes such as *Axoarcus*, *Gluconacetobacter* and *Herbaspirillum* (Siddiqui, 2006). The action of plant growth promoting microorganisms (PGPM) was studied intensively in the last decade; increment in biomass and fruit yield of various cropped species due to direct and indirect effects was documented (Gupta *et al.*, 2000; Saharan and Nehra, 2011). The most common direct effects are N fixation, phosphate solubilization, siderophore and phytohormone production, and indirect effects include induction of host plant resistance and antagonist against phytopathogen (Martínez-Viveros *et al.*, 2010; Ahemad and Kibret, 2014).

Even though the inoculation of plants with PGPM is carried out commercially in agriculture, the formulation of inoculum with a reliable and consistent

se encapsula en una goma polimérica. Se observaron efectos positivos de la encapsulación para PGPM sobre la masa radicular y la longitud de los brotes en *Triticum* sp., *V. radiata* y *Gossypium* sp. Las concentraciones de endurecedor y 2 % de goma tuvieron efectos positivos en la encapsulación de microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas.

Palabras clave: *Bacillus* sp., Inoculante, microcápsulas, crecimiento de las plantas, germinación de las semillas.

INTRODUCCIÓN

Hay un esfuerzo para usar microorganismos benéficos y promover el crecimiento de las plantas para reducir el uso intenso de agroquímicos y contribuir a la expansión de prácticas agrícolas sostenibles (Vassilev *et al.*, Cappellari *et al.*, 2013). Los tres grupos principales de microorganismos: hongos micorrízicos, hongos que promueven el crecimiento de las plantas y las rizobacterias, se consideran beneficiosos para el crecimiento de las plantas (Harman *et al.*, 2004; Malusá *et al.*, 2012). Los hongos micorrízicos incluyen micorrizas arbusculares y ectomicorrizas de múltiples clados fúngicos, como la *Glomeromycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota* (Kuo *et al.*, 2014). Los hongos promotores del crecimiento de plantas libre incluyen especies de los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Phoma* (Harman *et al.*, 2004; Salas, 2011). Las rizobacterias promotores del crecimiento de las plantas comprenden los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Pseudomonas*, y algunos endofitos como *Axoarcus*, *Gluconacetobacter* y *Herbaspirillum* (Siddiqui, 2006). La acción de los microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (PGPM) se estudió intensamente en la década reciente; el aumento de la biomasa y la producción de frutas de diversas especies cultivadas, debido a efectos directos e indirectos de los microorganismos se documentó (Gupta *et al.*, 2000; Saharan y Nehra, 2011). Los efectos directos más comunes son la fijación de N, la solubilización del fosfato, la producción de sideróforo y fitohormonas, y los efectos indirectos incluyen la inducción de la resistencia de las plantas huésped y el antagonismo contra el fitopatógeno (Martínez-Viveros *et al.*, 2010; Ahemad y Kibret, 2014).

Aunque la inoculación de plantas con PGPM se realiza comercialmente en la agricultura, la formulación

effect under field conditions is still problematic (Malusá *et al.*, 2012). Successful formulation of PGPM must overcome difficulties arising from unfavorable soil temperature, humidity, salinization, UV-radiation, soil pH and water stresses (García *et al.*, 2011). A key aspect of successful inoculation technology is to avoid losing activity of PGPM through the use of proper inoculum formulation and selection of an adequate carrier (Malusá *et al.*, 2012). The carrier helps to deliver a suitable amount of microorganism in good physiological condition, which can then provide a suitable microenvironment and assure sufficient shelf life. Among the natural materials utilized as carriers, organic polymers are widely used (Bashan *et al.*, 2002; Yabur *et al.*, 2007). Organic polymers are compounds that cross-link forming a matrix, which temporarily encapsulates or immobilizes microorganisms that are then gradually released during polymer degradation (Malusá *et al.*, 2012). The use of polymer-based encapsulation offers protection against environmental stress and consequently enhances the survival and release of microorganisms into the soil or seed (Guo *et al.*, 2012). Materials used for polymer encapsulation ideally should be inexpensive and easily available, such as carboxymethyl cellulose, guar gum, xanthan gum, alginate and starch (Bhardwaj *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, 2011).

The effect of polymer-based encapsulation on performance of PGPM has been evaluated. However there is no systematic analysis on the performance of these microorganisms when encapsulated in a polymer-based matrix. In this context, the present meta-analysis addresses the following questions: 1) does polymer-based encapsulation enhance microorganism performance? 2) is the response of polymer-based encapsulation of PGPM similar for all plant species? 3) what plant structures are most influenced when plants are inoculated with polymer-based encapsulated PGPM? 4) does the hardener or gum concentration of the polymer influence the performance of the encapsulated PGPM?

MATERIALS AND METHODS

Definition of literature to search

In this meta-analysis we examined the effectiveness of using polymer-based microencapsulated agents on PGPM in different

del inóculo con un efecto confiable y consistente en condiciones de campo es todavía problemática (Malusá *et al.*, 2012). La formulación exitosa de PGPM debe superar temperaturas humedad, salinidad y radiación UV, y estrés hídrico pH del suelo desfavorables (García *et al.*, 2011). Un aspecto clave de la tecnología de inoculación exitosa es evitar la pérdida de actividad de PGPM mediante la formulación adecuada del inóculo y la selección de un portador apropiado (Malusá *et al.*, 2012). El portador ayuda a suministrar la cantidad adecuada de microorganismos en buenas condiciones fisiológicas, lo que puede proporcionar un microambiente adecuado y asegurar la suficiente vida útil. Entre los materiales naturales utilizados como portadores, los polímeros orgánicos se utilizan ampliamente (Bashan *et al.*, 2002, Yabur *et al.*, 2007). Los polímeros orgánicos son compuestos que se reticulan formando una matriz, que temporalmente encapsula o inmoviliza microorganismos y luego se liberan gradualmente, durante la degradación del polímero (Malusá *et al.*, 2012). La encapsulación con polímeros ofrece protección contra el estrés ambiental y, en consecuencia, aumenta la supervivencia y liberación de microorganismos en el suelo o en la semilla (Guo *et al.*, 2012). Los materiales usados para la encapsulación en polímeros deberían ser económicos y disponibles, como la carboximetilcelulosa, la goma de guar, la goma de xantano, el alginato y el almidón (Bhardwaj *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, 2011).

El efecto de la encapsulación basada en polímeros sobre el rendimiento de PGPM se ha evaluado. Pero no hay un análisis sistemático del rendimiento de estos microorganismos cuando se encapsulan en una matriz con polímeros. En este contexto, el presente meta-análisis aborda las siguientes preguntas: 1) ¿la encapsulación basada en polímeros mejora el rendimiento de los microorganismos? 2) ¿es la respuesta de la encapsulación basada en polímeros de PGPM similar para todas las especies de plantas? 3) ¿cuáles son las estructuras vegetales más influenciadas cuando las plantas se inoculan con PGPM encapsulado basado en polímeros? 4) ¿el endurecedor o la concentración de goma del polímero influye en el rendimiento del PGPM encapsulado?

crops. The population was defined as the encapsulated and non-encapsulated microorganisms (rhizobacteria or free-living plant growth promoting fungi) used to promote growth in various crops. In the first round of literature search, studies were included if at least one of the following aspects were addressed as a core question in the work: 1) comparison of performance of polymer-based encapsulated and non-encapsulated PGPM, 2) comparison of different concentration of the polymer-based matrix or hardener for encapsulation were evaluated, and 3) evaluation of the seed germination or plant growth components were evaluated.

Collection of database and inclusion criteria

An electronic search was carried out from November 2013 to February 2014. Relevant published papers were retrieved through searches in Google Scholar and top peer review journals indexed in: Only Library, Science Direct, Springer Journal, Taylor & Francis and Wiley Online Library. For the studies search, the following combination of the keywords were used: "microcapsules", "capsules", "microorganisms", "growth", "promoting", "germination", "bacteria", "plant", "sodium alginate", "antagonist" and "fungi".

The literature search comprehensively retrieved all relevant scientific studies reporting the effectiveness of using microencapsulated agents on PGPM for a wide variety of crops. Approximately 117 references were examined based on title, abstracts, and keywords within the first evaluation stage of this study. A subset of 91 irrelevant reports were excluded and 26 potential articles were identified to fulfill the eligibility criteria: 1) studies had to quantify the effects of polymer-based encapsulated and non-encapsulated PGPM on seed germination or plant growth variables (leaf area, leave biomass, root biomass, shot biomass, total biomass, number of leaves, root length and shot length); 2) studies had to include among their treatments the polymer-based encapsulated and the non-encapsulated PGPM, the latter was used as their respective control; 3) studies had to use natural polymers like gums to encapsulate microorganisms; 4) studies had to be written in English and be published in the peer-reviewed literature. We obtained 11 articles published between 2002 and 2012 that satisfied these criteria (Table 1; Appendix A), and from them we selected 41 cases to be evaluated by the meta-analysis.

Methodological assessment and data extraction

Before risk of bias assessment (BA) and data extraction (DE), the papers were selected through abstract screening and confirmed using the full articles. To conduct the DE the appropriate studies

MATERIALES Y MÉTODOS

Definición de la literatura a buscar

En este meta-análisis examinamos la eficacia del uso de agentes microencapsulados basados en polímeros para PGPM en diferentes cultivos. La población se definió como los microorganismos encapsulados y no encapsulados (rizobacterias u hongos promotores del crecimiento libre de plantas) utilizados para promover el crecimiento en diversos cultivos. En la primera ronda de búsqueda de literatura, se incluyeron los estudios en los que al menos se abordó uno de los siguientes aspectos como un tema central en el trabajo: 1) comparación del rendimiento de PGPM encapsulado y no encapsulado basado en polímeros; 2) evaluación de la comparación de las diferentes concentraciones de la matriz a base de polímeros o endurecedor para la encapsulación; y 3) evaluación de la germinación de las semillas o de los componentes del crecimiento de las plantas.

Recopilación de datos y criterios de inclusión

Una búsqueda electrónica se realizó de noviembre de 2013 a febrero de 2014. Los artículos relevantes publicados se recuperaron mediante búsquedas en Google Scholar y revistas de primer nivel evaluadas por colegas e indexadas en: Only Library, Science Direct, Springer Journal, Taylor & Francis y Wiley Online Library. Para buscar estudios se usaron las siguientes combinaciones de palabras clave: "microcápsulas", "cápsulas", "microorganismos", "crecimiento", "promoción", "germinación", "bacterias", "planta", "alginato de sodio", "antagonista" y "hongos".

En la búsqueda bibliográfica se recuperaron todos los estudios científicos relevantes que reportan la efectividad del uso de agentes microencapsulados en PGPM para una amplia variedad de cultivos. Aproximadamente se examinaron 117 referencias con base en el título, resúmenes y palabras clave dentro de la primera etapa de evaluación de este estudio. Un subconjunto de 91 informes irrelevantes se excluyó y se identificaron 26 artículos potenciales para cumplir con los criterios de elegibilidad: 1) los estudios tenían que cuantificar los efectos de PGPM encapsulada y no encapsulada basada en polímeros en la germinación de las semillas o en las variables de crecimiento de las plantas (área foliar, biomasa de hojas, biomasa de raíces, biomasa de brotes, biomasa total, número de hojas, longitud de raíces y de brotes); 2) los estudios tenían que incluir entre sus tratamientos la PGPM encapsulada y no encapsulada basada en polímeros y esta última se usó como control; 3) los estudios tuvieron que usar polímeros naturales como gomas para encapsular microorganismos; 4) los estudios tenían que presentarse en inglés y publicarse en la literatura revisada por expertos. Se obtuvieron 11 artículos publicados

Table 1. Overview of the data sources. Plant process: SG = Seed germination; PG = Plant growth. Plant growth structure: LA = Leaf area; LB = Leaves biomass; LN = Leaves number; SB = Shoot biomass; SL = Shoot length; RL = Root length; RB = Root biomass; TB = Total biomass.

Cuadro 1. Visión general de las fuentes de datos. Proceso de la planta: SG = germinación de semillas; PG = Crecimiento de la planta. Estructura de crecimiento de la planta; LA = área foliar; LB = Biomasa de las hojas; LN = Número de hojas; SB = Biomasa de los brotes; SL = Longitud de los brotes; RL = Longitud de la raíz; RB = Biomasa de la raíz; TB = Biomasa total.

Reference	Microorganism	Strain	Concentration (CFU/mL ⁻¹)	Plant species	Plant process	Concentration (%) Hardener	Gum	N	Plant growth structure
El-Katatny (2010)	<i>Trichoderma harzianum</i>	T24	3x10 ⁹	<i>Lycopersicon esculentum</i>	SG	2	2	3	RL
El-Katatny (2010)	<i>Azospirillum brasilense</i>	Az	5x10 ¹⁴	<i>L. esculentum</i>	SG	2	2	3	RL
El-Katatny (2010)	<i>T. harzianum</i>	T24	3x10 ⁹	<i>L. esculentum</i>	SG	2	2	3	SB
El-Katatny (2010)	<i>A. brasilense</i>	Az	5x10 ¹⁴	<i>L. esculentum</i>	SG	2	2	3	SB
El-Katatny (2010)	<i>T. harzianum</i>	T24	3x10 ⁹	<i>L. esculentum</i>	SG	2	2	3	SL
El-Katatny (2010)	<i>A. brasilense</i>	Az	5x10 ¹⁴	<i>L. esculentum</i>	SG	2	2	3	SL
Guo <i>et al.</i> (2012)	<i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	--	1x10 ¹²	<i>Gossypium</i> sp.	PG	2	1.8	5	RL
Guo <i>et al.</i> (2012)	<i>K. oxytoca</i> & <i>B. subtilis</i>	--	1x10 ¹²	<i>Gossypium</i> sp.	PG	2	1.8	5	SL
Guo <i>et al.</i> (2012)	<i>K. oxytoca</i> & <i>B. subtilis</i>	--	1x10 ¹²	<i>Gossypium</i> sp.	PG	2	1.8	5	TB
Hernández <i>et al.</i> (2010)	<i>Bacillus subtilis</i>	BIJ1M2	1x10 ⁹	<i>L. esculentum</i>	PG	2	2	12	LA
Hernández <i>et al.</i> (2010)	<i>B. subtilis</i>	BIJ1M2	1x10 ⁹	<i>L. esculentum</i>	PG	2	2	12	LB
Hernández <i>et al.</i> (2010)	<i>B. subtilis</i>	BIJ1M2	1x10 ⁹	<i>L. esculentum</i>	PG	2	2	12	RB
Hernández <i>et al.</i> (2010)	<i>B. subtilis</i>	BIJ1M2	1x10 ⁹	<i>L. esculentum</i>	PG	2	2	12	SB
Hernández <i>et al.</i> (2010)	<i>B. subtilis</i>	BIJ1M2	1x10 ⁹	<i>L. esculentum</i>	PG	2	2	12	SL
Omer (2010)	<i>Bacillus megaterium</i>	--	1x10 ⁸	<i>Vicia faba</i>	SG	0.05	1	100	SL
Rekha <i>et al.</i> (2007)	<i>B. subtilis</i>	CC-pg104	2x10 ⁸	<i>Lactuca sativa</i>	SG	1.5	2	4	RL
Rekha <i>et al.</i> (2007)	<i>B. subtilis</i>	CC-pg104	2x10 ⁸	<i>L. sativa</i>	SG	1.5	2	4	SL
Wu <i>et al.</i> (2011)	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Rs-5	1x10 ¹³	<i>Gossypium</i> sp.	PG	2	2	6	RL
Wu <i>et al.</i> (2011)	<i>K. oxytoca</i>	Rs-5	1x10 ¹³	<i>Gossypium</i> sp.	PG	2	2	6	SL
Wu <i>et al.</i> (2011)	<i>K. oxytoca</i>	Rs-5	1x10 ¹³	<i>Gossypium</i> sp.	PG	2	2	6	TB
Young <i>et al.</i> (2006)	<i>B. subtilis</i>	CC-pg104	1x10 ⁸	<i>L. sativa</i>	SG	1.5	2	4	RL
Young <i>et al.</i> (2006)	<i>B. subtilis</i>	CC-pg104	1x10 ⁸	<i>L. sativa</i>	SG	1.5	2	4	SL
Grandlic <i>et al.</i> (2009)	<i>Arthrobacter</i> sp. 1, 2.	Arthro Mix	10 ⁹	<i>Atriplex lentiformis</i>	--	1.65	3.5	5	TB
Grandlic <i>et al.</i> (2009)	<i>Clavibacter</i> sp.	MTR-21A	10 ⁹	<i>A. lentiformis</i>	--	1.65	3.5	5	TB
Grandlic <i>et al.</i> (2009)	<i>Rhodanobacter</i> sp.	MTR-45B	10 ⁹	<i>A. lentiformis</i>	--	1.65	3.5	5	TB
Grandlic <i>et al.</i> (2009)	<i>Arthrobacter</i> sp. 1,2.	Arthro Mix	10 ⁹	<i>Buchloe dactyloides</i>	--	1.65	3.5	5	TB
Grandlic <i>et al.</i> (2009)	<i>Clavibacter</i> sp.	MTR-21A	10 ⁹	<i>B. dactyloides</i>	--	1.65	3.5	5	TB
Grandlic <i>et al.</i> (2009)	<i>Rhodanobacter</i> sp.	MTR-45B	10 ⁹	<i>B. dactyloides</i>	--	1.65	3.5	5	TB
Jain <i>et al.</i> (2010)	<i>Aspergillus awamori</i>	S19	5x10 ⁷	<i>Vigna radiata</i>	PG	5.5	3	5	SL

Continúa Cuadro 1.

Continúa Cuadro 1.

Reference	Microorganism	Strain	Concentration (CFU/mL ⁻¹)	Plant species	Plant process	Concentration (%) Hardener	N	Plant growth structure
Jain <i>et al.</i> (2010)	<i>A. auamori</i>	S20	5x10 ⁷	<i>V. radiata</i>	PG	5.5	5	RL
Jain <i>et al.</i> (2010)	<i>A. auamori</i>	S21	5x10 ⁷	<i>V. radiata</i>	PG	5.5	5	SB
Jain <i>et al.</i> (2010)	<i>A. auamori</i>	S22	5x10 ⁷	<i>V. radiata</i>	PG	5.5	5	RB
Jain <i>et al.</i> (2010)	<i>A. auamori</i>	S23	5x10 ⁷	<i>V. radiata</i>	PG	5.5	5	TB
Jain <i>et al.</i> (2010)	<i>A. auamori</i>	S24	5x10 ⁷	<i>V. radiata</i>	PG	5.5	5	LN
Saxena (2011)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	BAM-4	10 ⁹	<i>Triticum</i> sp.	PG	1.11	4	SL
Saxena (2011)	<i>Burkholderia cepacia</i>	BAM-12	10 ⁹	<i>Triticum</i> sp.	PG	1.11	4	SL
Saxena (2011)	Mix bacteria	BAM-4, BAM-12	10 ⁹	<i>Triticum</i> sp.	PG	1.11	4	SL
Saxena (2011)	<i>P. fluorescens</i>	BAM-4	10 ⁹	<i>Triticum</i> sp.	PG	1.11	4	SB
Saxena (2011)	<i>B. cepacia</i>	BAM-12	10 ⁹	<i>Triticum</i> sp.	PG	1.11	4	SB
Saxena (2011)	Mix bacteria	BAM-4, BAM-12	10 ⁹	<i>Triticum</i> sp.	PG	1.11	4	SB
Vassilev <i>et al.</i> (2001)	<i>Glomus deserticola</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i> <i>G. deserticola</i>	10 ⁶	<i>L. sativa</i>	PG	5.5	5	SB

were analyzed and data extracted quantitatively. The data needed for analyses (sample size, means, standard deviations, F-test statistics, χ^2 or p-value) were reported in the article, either in numerical or graphical form, or could be provided by the authors on request. The studies with more than one study design were duplicated and extracted as separate studies. Many studies reported multiple treatment comparisons, which were extracted as unique treatment comparisons (trials) for analytic purposes. Information extracted from each study included: 1) gum and hardener concentration, (1) type of microencapsulated agent; 2) type of microorganism; 3) type of plant species and; 4) study results. Variables taken included: leaf area (LA), leave biomass (LB), root biomass (RB), shot biomass (SB), total biomass (TB), leave number (LN), root length (RL), shot length (SL). These data were extracted for the control and treated groups.

Meta-analysis

The meta-analysis was carried out with the MetaWin 2.1 statistical program (Rosenberg *et al.*, 2002). For performance of plant growth measures, the effect size was calculated as Hedges's d , the standardized mean difference (Gurevitch and Hedges, 2001) between encapsulated and non-encapsulated treatment means: $d = [(X_o - X_v)/s] J$, where X_o designates the mean of plant growth trait in encapsulated treatment, X_v is the corresponding mean for the non-encapsulated treatment, s is the pooled standard deviation, and J is the small-sample-size bias correction factor. When the mean and standard deviations needed for calculation of Hedges's d were presented in graphs, they were taken using ImageJ software (Rasband, 2012). In some studies these data were not available, and univariate statistics (F , χ^2 or p-value) were converted into Hedges's d estimates (Rosenberg *et al.*, 2002).

Analyses were performed using the mixed-effects model, which assumes that studies differ due to sampling error and random variation. Given that these sources of variation are likely to be important in biological data, the mixed-effects model is preferred for these analyses (Gurevitch and Hedges, 2001). Bias-corrected bootstrap 95 % confidence intervals around the effect size were generated from 999 iterations, and effects are considered to be significant when 95 % confidence interval did not include zero. For those mean-effect sizes that were significantly different from zero, we calculated a fail-safe number (n_s) using the weighted method of Rosenberg (2005). This number represents how many additional studies of null effect and mean weight should be added to reduce the significance level of the observer mean effect to 0.05. A fail-safe number greater than $5n+10$, where n is the original number of studies in the analysis, is considered robust against publication bias (Rosenthal, 1991). In addition, we examined publication

entre 2002 y 2012 que cumplieron con estos criterios (Cuadro 1, Anexo A), y de ellos seleccionamos 41 casos para evaluar con por el meta-análisis.

Evaluación metodológica y extracción de datos

Antes del riesgo de la evaluación sesgada (BA) y de la extracción de datos (ED), los estudios se seleccionaron mediante la proyección abstracta y se confirmaron utilizando los artículos completos. Para realizar la ED se analizaron estudios apropiados y se extrajeron los datos cuantitativamente.

Los datos necesarios para los análisis (tamaño de la muestra, medias, desviaciones estándar, estadística de la prueba F , χ^2 o valor p) se reportaron en el artículo, ya sea en forma numérica o gráfica, o podrían ser proporcionados por los autores a petición. Los estudios con más de un diseño de estudio se duplicaron y extrajeron como estudios separados. Muchos estudios reportaron múltiples comparaciones de tratamiento, que se extrajeron como comparaciones de tratamiento únicas (ensayos) con fines analíticos. La información extraída de cada estudio incluyó: (1) concentración de goma y endurecedor, 1) tipo de agente microencapsulado; 2) tipo de microorganismo; 3) tipo de especie vegetal y; 4) resultados del estudio. Las variables tomadas incluyeron: área foliar (LA), biomasa de hojas (LB), biomasa de raíz (RB), biomasa de brotes (SB), biomasa total (TB), número de hojas (LN), longitud de raíz (RL), longitud de brote (SL). Estos datos se extrajeron para el testigo y los grupos tratados.

Meta-análisis

El meta-análisis se realizó con el programa estadístico MetaWin 2.1 (Rosenberg *et al.*, 2002). Para el rendimiento de las medidas de crecimiento de la planta, el tamaño del efecto se calculó como d de Hedges, la diferencia de medias estandarizada (Gurevitch y Hedges, 2001) entre el tratamiento encapsulado y no encapsulado significa: $d = [(X_o - X_v)/s] J$, donde X_o designa la media del rasgo de crecimiento de la planta en el tratamiento encapsulado, X_v es la media correspondiente para el tratamiento no encapsulado, s es la desviación estándar agrupada y J es el factor de corrección de sesgo de tamaño de muestra pequeño. Cuando la media y las desviaciones estándar necesarias para el cálculo de d de Hedges se presentaron en gráficos, se tomaron usando el software ImageJ (Rasband, 2012). En algunos estudios, estos datos no aparecían y las estadísticas univariadas (F , χ^2 o valor p) se convirtieron en las estimaciones d de Hedges (Rosenberg *et al.*, 2002).

Los análisis se realizaron con el modelo de efectos mixtos, que supone que los estudios difieren debido al error de muestreo y la variación aleatoria. Ya que es probable que estas fuentes de

bias by mean of funnel plots (Light and Pillemer, 1984). Funnel plots revealed a low probability that publication bias affected the data set. To test whether patterns differed among the explanatory variables discussed above (type of microorganism, plant species, plant growth structure, plant process, hardener and gum concentration) studies were subdivided into corresponding groups, and between-group heterogeneity was examined using the χ^2 statistic Q_b (Gurevitch and Hedges, 2001). All figures were made using SigmaPlot version 11 from Systat Software.

RESULTS AND DISCUSSION

The general response of the PGPM to the polymer-based encapsulation was positive [E ++ (mean effects size) = 0.8700; 95 % Bias CI (confidence interval) = 0.02171 to 1.5178], although there was a clear difference among microorganism species (df=11, $Q=22.6$, $p=0.01$). The fungus *Trichoderma harzianum* showed negative effect, and the bacteria *Rhodanobacter* sp., *Anthrobacter* sp. and *Azospirillum brasilense* corrig. Tarrand *et al.* (1979) showed no response to the polymer-based encapsulation (Figure 1).

The effects of polymer-based encapsulated PGPM in various plant species had a positive general tendency [E ++ (mean effects size) = 0.8654; 95 % Bias CI (confidence interval) = 0.3093 to 1.5350]. Differential effects among plant species were not detected (df=6, $Q=6.6$, $p=0.35$), but the magnitude of the effect showed some variation (Figure 2). For example, in *Triticum* sp., *Vigna radiata* and *Gossypium* sp. there was a positive trend in the response, whereas in buffalo grass [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.], big salbrush [*Atriplex lentiformis* (Torr.) S. Watts], lettuce (*Lactuca sativa* L. 1753) and tomato (*Solanum lycopersicum* L.), there was no response (Figure 2).

Plant growth was separated into the analysis of different plant structures, as well as the plant process. For plant growth, the effect of polymer-based encapsulation of PGPM was positive in 67.69 % of species used in this study [E ++ (mean effects size) = 0.6769; 95 % Bias CI (confidence interval) = 0.1008 to 1.3027]. The magnitude of increase in growth, however, was different among plant structures (df=4, $Q=13.91$, $p=0.007$) in which only the root mass and shoot length showed a significant effect by inoculation of polymer-based encapsulated relative to free-cell PGPM; while total plant mass, shoot mass, and root length showed no apparent effect (Figure 3a).

variación sean importantes en los datos biológicos, se prefiere el modelo de efectos mixtos para estos análisis (Gurevitch y Hedges, 2001). A partir de 999 iteraciones se generaron intervalos de confianza del 95 % corregidos mediante bootstrap alrededor del tamaño del efecto. Los efectos se consideraron significativos cuando el 95 % de los intervalos de confianza no incluyeron el cero. Para los tamaños de efecto medio significativamente diferentes de cero, se calculó un número de seguridad (nfs) con el método ponderado de Rosenberg (2005). Este número representa los estudios adicionales de efecto nulo y peso medio se debe que agregar para reducir el nivel de significación del efecto medio del observador a 0.05. Un número a prueba de fallos mayor que $5n+10$, donde n es el número original de estudios en el análisis, se considera importante para contrarrestar la publicación parcial (Rosenthal, 1991). Además, examinamos el sesgo en las publicaciones por medio de parcelas en embudo (Light y Pillemer, 1984). Las gráficas de embudo revelaron una baja probabilidad de que el sesgo en las publicaciones afectara el conjunto de datos. Para probar si los patrones difieren entre las variables explicativas ya analizadas (tipo de microorganismos, especie de la planta, estructura de crecimiento de la planta, proceso de la planta, endurecedor y concentración de la goma), los estudios se subdividieron en grupos correspondientes y la heterogeneidad entre grupos se examinó utilizando la estadística $\chi^2 Q_b$ (Gurevitch y Hedges, 2001). Todas las figuras se hicieron usando SigmaPlot versión 11 de Systat Software.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La respuesta general de PGPM a la encapsulación basada en polímeros fue positiva [E ++ (tamaño de los efectos medios) = 0.8700; 95 % Bias CI (intervalo de confianza) = 0.02171 a 1.5178], aunque hubo clara diferencia entre las especies de microorganismos (df=11, $Q=22.6$, $p=0.01$). El hongo *Trichoderma harzianum* mostró efecto negativo, y las bacterias *Rhodanobacter* sp., *Anthrobacter* sp. y *Azospirillum brasilense* corrig. Tarrand *et al.* (1979) no tuvieron respuesta a la encapsulación basada en polímeros (Figura 1).

Los efectos de PGPM encapsulado basado en polímeros en varias especies de plantas mostraron tendencia general positiva [E ++ (tamaño de los efectos medios) = 0.8654; IC del sesgo del 95% (intervalo de confianza) = 0.3093 a 1,5350]. No se detectaron efectos diferenciales entre las especies de plantas (df=6, $Q=6.6$, $p=0.35$), pero la magnitud del efecto mostró cierta variación (Figura 2). Por ejemplo, en *Triticum* sp., *Vigna radiata* y *Gossypium* sp. hubo una tendencia positiva en la respuesta, mientras que en

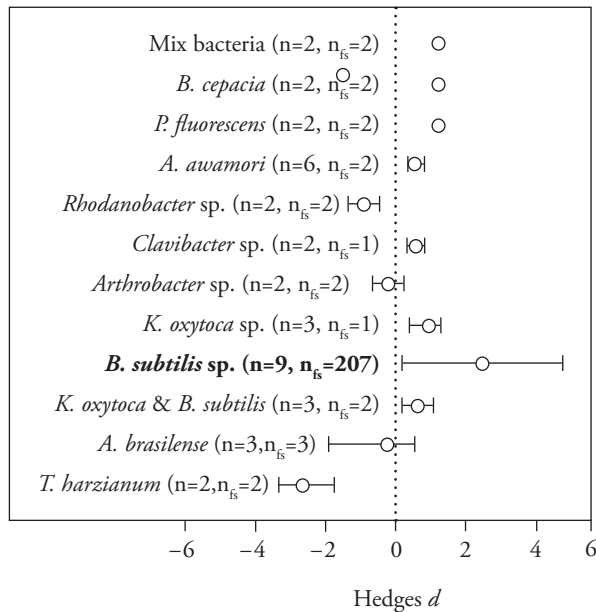


Figure 1. Mean Hedges's d effect sizes ($\pm$ 95 % bias-corrected confidence intervals), sample sizes, and fail-safe numbers (n_f) for studies comparing polymer-based encapsulated versus non-encapsulated PGPM. Significant patterns occur when the intervals fail to include zero, which is marked with a dotted line. Microorganisms species in bold indicate that the fail-safe number is robust ($> 5n + 10$).

Figura 1. Promedio de los tamaños de efecto de Hedges ($\pm$ 95% de los intervalos de confianza corregidos por sesgo), tamaños de muestra y números de seguridad (n_f) para los estudios que comparan PGPM encapsulado en base a polímero frente a PGPM no encapsulado. Los patrones significativos ocurren cuando los intervalos no incluyen cero, que está marcado con una línea punteada. Las especies de microorganismos en negrita indican que el número de seguridad es elevado ($> 5n + 10$).

The response of plant process was categorical in comparison with plant growth and seed germination. However, the plant structures and plant process were not collinear. A trend of positive effect of polymer-based encapsulated PGPM was in general found [E ++ (mean effects size) = 0.9680; 95 % Bias CI (confidence interval) = 0.3714 to 1.6551]. The response on plant growth was highly positive, while on seed germination there was no response (df=1, $Q=21.42$, $p \leq 0.0001$) (Figure 3b).

The concentrations of the hardener produced differential responses in the performance of the polymer-based encapsulated PGPM [E ++ (mean effects size) = 0.8652; 95 % Bias CI (confidence

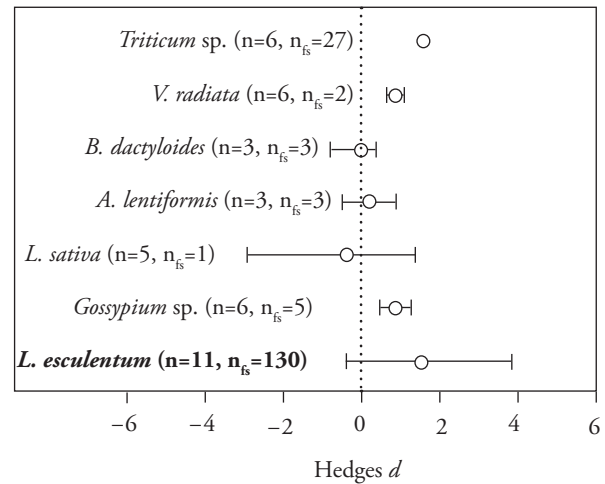


Figure 2. Mean Hedges's d effect sizes ($\pm$ 95 % bias-corrected confidence intervals), sample sizes, and fail-safe numbers (n_f) for studies comparing the effects of polymer-based encapsulated versus non-encapsulated PGPM in different plant species. Significant patterns occur when the intervals fail to include zero, which is marked with a dotted line. Plant species in bold indicate that the fail-safe number is robust ($> 5n + 10$).

Figura 2. Media de tamaños de efecto de Hedges ($\pm$ 95 % de los intervalos de confianza corregidos por sesgo), tamaños de muestra y números de seguridad (n_f) para estudios que comparan los efectos de PGPM encapsulado en base a polímeros frente a PGPM no encapsulado en diferentes especies de plantas. Los patrones significativos ocurren cuando los intervalos no incluyen cero, lo cual está marcado con una línea punteada. Las especies de plantas en negrita indican que el número de seguridad por fallas es elevado ($> 5n + 10$).

la hierba de búfalo [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm], gran salbrush [*Atriplex lentiformis* (Torr.) S. Watts], Lechuga (*Lactuca sativa* L. 1753) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.), no hubo respuesta (Figura 2).

El crecimiento de las plantas se dividió en el análisis de las estructuras de las plantas y en el proceso de la planta. Para el crecimiento de las plantas, el efecto de la encapsulación polimérica de PGPM fue positivo en 67.69 % de las especies utilizadas en este estudio [E ++ (tamaño de los efectos medios) = 0.6769; IC del sesgo del 95 % (intervalo de confianza) = 0.1008 a 1.3027]. Sin embargo, la magnitud del aumento en el crecimiento fue diferente entre las estructuras de las plantas (df=4, $Q=13.91$, $p=0.007$), en las que sólo la masa de la raíz y la longitud de

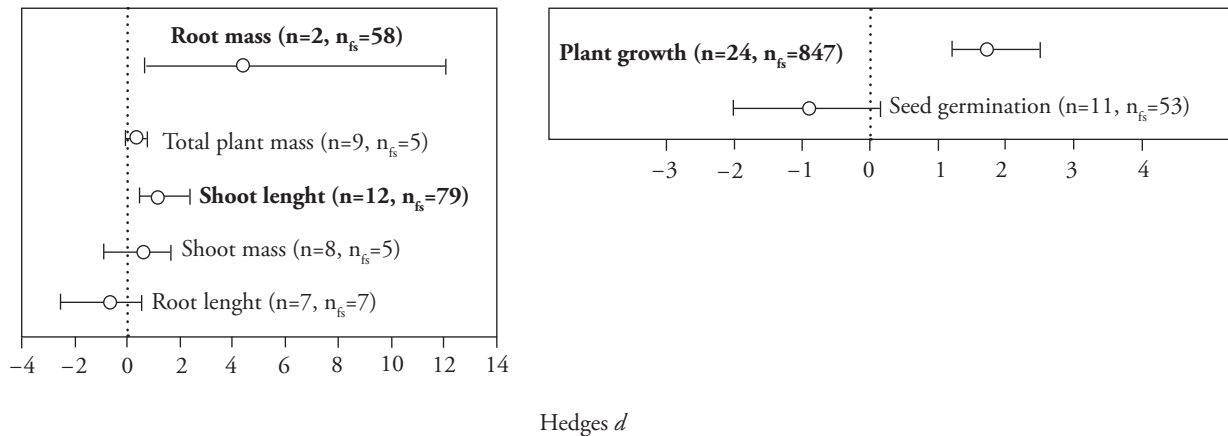


Figure 3. Mean Hedges's d effect sizes ($\pm 95\%$ bias-corrected confidence intervals), sample sizes, and fail-safe numbers (n_s) for studies comparing the effect of polymer-encapsulated versus non-encapsulated PGPM on growth of different plant structures (a) and plant process (b). Significant patterns occur when the intervals fail to include zero, which is marked with a dotted line. Plant structures and process in bold indicate that the fail-safe number is robust ($> 5n + 10$).

Figura 3. Media de tamaños de efecto de Hedges ($\pm 95\%$ de los intervalos de confianza corregidos por sesgo), tamaños de muestras y números de seguridad por fallas (n_s) para estudios que comparan el efecto del PGPM encapsulado en polímeros frente al PGPM no encapsulado sobre el crecimiento de diferentes estructuras vegetales (a) y el proceso de la planta (b). Los patrones significativos ocurren cuando los intervalos no incluyen cero, lo cual está marcado con una línea punteada. Las estructuras de la planta y el proceso señalados en negrita indican que el número de seguridad por fallas es elevado ($> 5n + 10$).

interval) = 0.3273 to 1.5450]. The effect however was not significant ($df=4$, $Q=6.8$, $p=0.14$), but an unimodal response for 1.1, 2 and 5.55 % (low and higher percentage of hardener) of improvement performance of polymer-based encapsulated PGPM was observed (Figure 4a). All gum concentrations, except the highest (3.5 %), showed beneficial effects on the performance of PGPM [E ++ (mean effects size) = 0.8702; 95 % Bias CI (confidence interval) = 0.2977 to 1.5245] (Figure 4b). No differential effects among gum concentrations were observed ($df=3$, $Q=2.18$, $p=0.53$), but the results for the concentration of 2 % were robust (Figure 4b).

The present meta-analysis uncovers the effects of polymer-based encapsulation on performance of PGPM. Our main findings are as follows: 1) most of the PGPM included in the study responded positively and similarly in magnitude to polymer-based encapsulation, some of them, however, showed no response, and in the case of *Trichoderma harzianum* a negative response was observed; 2) the effects of encapsulation on performance of PGPM depended on the plant species inoculated, in this sense, clear trend of positive effects were observed on *Triticum* sp., *Vigna radiate* and *Gossypium* sp.; 3) increases in root mass and shoot length were the

los brotes mostraron un efecto significativo por la inoculación de PGPM encapsulado basado en polímeros de células libres; mientras que la masa total de la planta, la masa de los brotes y la longitud de la raíz no mostraron ningún efecto (Figura 3a).

La respuesta del proceso de las plantas fue categórica en comparación con el crecimiento de las plantas y la germinación de las semillas. Sin embargo, las estructuras de las plantas y su proceso no fueron colineales. En general, se encontró una tendencia de efecto positivo de la PGPM encapsulada basada en polímeros [E ++ (media de tamaños de los efectos) = 0.9680; IC del sesgo del 95% (intervalo de confianza) = 0.3714 a 1.6551]. La respuesta sobre el crecimiento de las plantas fue altamente positiva, mientras que en la germinación de las semillas no hubo respuesta ($df=1$, $Q=21.42$, $p\leq 0.0001$) (Figura 3b).

Las concentraciones de endurecedor produjeron respuestas diferentes en el rendimiento de la PGPM encapsulada basada en polímeros [E ++ (media de los tamaños de los efectos) = 0.8652; IC del sesgo de 95 % (intervalo de confianza) = 0.3273 a 1.5450]. El efecto, sin embargo, no fue significativo ($df=4$, $Q=6.8$, $p=0.14$), pero se observó una respuesta unimodal para 1.1, 2 y 5.55 % (bajo y mayor porcentaje de endurecedor) de mejor rendimiento de la PGPM

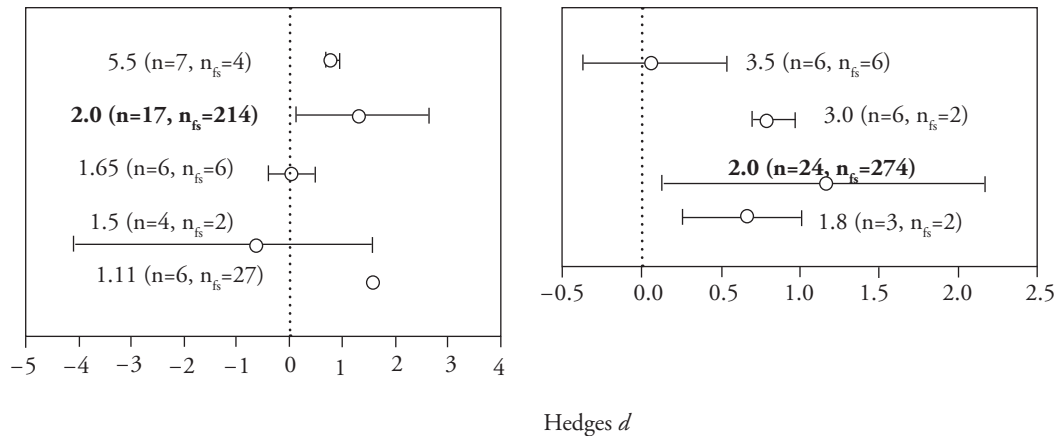


Figure 4. Mean Hedges's d effect sizes ($\pm$ 95 % bias-corrected confidence intervals), sample sizes, and fail-safe numbers (nfs) for studies comparing hardener (a) and polymeric gum concentration (%) (b) for encapsulating material. Significant patterns occur when the intervals fail to include zero, which is marked with a dotted line. Hardener and polymeric gum concentrations in bold indicate that the fail-safe number is robust ($>5n+10$).

Figura 4. Media de tamaños de efectos de Hedges ($\pm$ 95% de los intervalos de confianza corregidos por sesgo), tamaños de muestras y números de seguridad por fallas (nfs) para estudios que comparan el endurecedor (a) y la concentración de goma polimérica (%) (b) para encapsular el material. Los patrones significativos ocurren cuando los intervalos no incluyen cero, que está marcado con una línea punteada. El endurecedor y las concentraciones de goma polimérica en negrita indican que el número de seguridad por fallas es elevado ($>5n + 10$).

most common effects when plants were inoculated with polymer-based encapsulated PGPM; however, seed germination was unaffected when seeds were inoculated with polymer-based encapsulated PGPM; 4) concentration of the hardener and gum influenced the performance of PGPM when encapsulated with positive effects observed when concentrations of both hardener and polymer were 2 %, respectively. It is important to point out that in all cases the results are strongly influenced by the number of studies analyzed. As indicated by the fail safe number, most of our results were not robust enough to draw decisive conclusions (Fragkos *et al.*, 2014), but there was a clear trend on the increase of PGPM performance when encapsulated in a polymer-based matrix. However, Belman and Wolfson (2014) consider that with a low number of articles, the case studies (41) could be a good number for meta-analysis if inclusion criteria were restricted to horticultural crop area. In spite of this, other studies could consider vote-counting techniques (where inclusion criteria used could increase to add studies to the meta-analysis) to strengthen evidence about this item (Butler *et al.*, 2012).

Our analysis showed that in most of the PGPM species (67 %) the effects of using polymer-based

encapsulada basada en polímeros (Figura 4a).

Todas las concentraciones de goma, excepto la más elevada (3.5 %), mostraron efectos beneficiosos sobre el rendimiento de PGPM [E ++ (media de tamaños de los efectos) = 0.8702; IC del sesgo de 95 % (intervalo de confianza) = 0.2977 a 1.5245] (Figura 4b). No se observaron efectos diferentes entre las concentraciones de goma ($df=3$, $Q=2.18$, $p=0.53$), pero los resultados para la concentración del 2 % fueron elevados (Figura 4b).

El presente metanálisis revela los efectos de la encapsulación basada en polímeros en el rendimiento de PGPM. Nuestros hallazgos principales son los siguientes: 1) la mayoría de las PGPM incluidas en el estudio respondieron positivamente y de forma similar en magnitud a la encapsulación basada en polímeros; sin embargo, algunas de ellas no mostraron respuesta y en el caso de *Trichoderma harzianum* se obtuvo una respuesta negativa; 2) los efectos de la encapsulación sobre el rendimiento de PGPM dependieron de las especies de plantas inoculadas y en este sentido se observó una clara tendencia de efectos positivos en *Triticum* sp., *Vigna radiata* y *Gossypium* sp. y 3) los aumentos en la masa de las raíces y la longitud de los brotes fueron los efectos más comunes cuando las plantas fueron inoculadas con PGPM

encapsulating agent were positive compared to the effects of non-encapsulated PGPM. About one quarter of the species, however, showed no response to the encapsulation. It is important one case (*Trichoderma harzianum*) where the effect of the encapsulation was negative, which is due to bacteria having a better germination process than fungi, when used individually (El-Katatny, 2010).

The reason why not all PGPM showed positive response to the encapsulation might be related to two aspects: 1) there are species of microorganisms that naturally have a resistance *per se* to the harsh environment when exposed to these conditions; thus, adding a polymer-based matrix does not help to enhance the performance, specially for microorganisms that form biofilms and those that have the ability to recognize and cope with physical and chemical stressful conditions of a particular environment (Santos *et al.*, 2010); 2) the polymer may have affected the viability or release of cells. This was observed in studies where different types of gums and species of PGPM were evaluated (Tittabutr *et al.*, 2007).

We also observed that the response of the polymer-based encapsulated PGPM depended on, to a certain degree, the plant species evaluated. Surprisingly, in the species *Lycopersicon esculentum*, where several studies have been carried out, there was no positive effect of encapsulating PGPM. In this case, the germination levels influenced plant growth thus masking their positive effect following meta-analysis. This occurs because during seed germination the plant requires an immediate response from PGPM, however the onset of encapsulated PGPM action is often delayed due to the fact that the majority of the polymeric capsules are designed for prolonged release (Serban *et al.*, 2010).

The difference in response among plant species might be attributed to aspects of the interaction between the microorganisms and plant roots. Various studies point out the importance of the association of microorganisms to plant when interacting in the rhizosphere (Saharan and Nehra, 2011). Thus, the polymer-based matrix might influence recognition of beneficial microorganisms by the plant roots, either by affecting physiological aspects of the association or by affecting the plant root system (Salamoni *et al.*, 2010).

In our analysis we also found that when PGPM were encapsulated, plant growth was enhanced, in two

encapsulado basado en polímeros; sin embargo, la germinación de las semillas no se afectó cuando las semillas se inocularon con PGPM encapsulada basada en polímeros; 4) la concentración del endurecedor y la goma influyeron en el rendimiento de la PGPM cuando se encapsuló con efectos positivos observados cuando las concentraciones tanto del endurecedor como del polímero fueron de 2 %. Es importante señalar que en todos los casos los resultados están fuertemente influenciados por el número de estudios analizados.

Como lo indica el número de seguridad por fallas, casi todos los resultados que obtuvimos no fueron lo suficientemente sólidos como para sacar conclusiones decisivas (Fragkos *et al.* 2014, pero hubo tendencia clara al rendimiento mayor de PGPM cuando se encapsuló en una matriz polimérica. Sin embargo, Belman y Wolfson (2014) consideran que con un bajo número de artículos, los estudios de caso (41) podrían ser un buen número para el metanálisis si los criterios de inclusión se restringieran al área de cultivo hortícola. A pesar de esto, otros estudios podrían considerar técnicas de conteo de votos (donde los criterios de inclusión utilizados podrían aumentar para agregar estudios al metanálisis) para fortalecer la evidencia sobre este ítem (Butler *et al.*, 2012).

Nuestro análisis muestra que en la mayoría de las especies PGPM (67%) los efectos de un agente encapsulado a base de polímeros fueron positivos, comparados con los efectos de PGPM no encapsulada. Sin embargo, cerca de un cuarto de las especies no mostró respuesta a la encapsulación. Es importante un caso (*Trichoderma harzianum*) en que el efecto de la encapsulación fue negativo porque las bacterias tienen un mejor proceso de germinación que los hongos al usarse individualmente (El-Katatny, 2010).

La razón por la que no todas las PGPM mostraron una respuesta positiva a la encapsulación podría estar relacionada con dos aspectos: 1) hay especies de microorganismos que tienen una resistencia natural *per se* al medio ambiente severo cuando se exponen a esas condiciones; así, la adición de una matriz basada en polímeros no ayuda a mejorar el rendimiento, especialmente para los microorganismos que forman biofilms y aquellos que tienen la capacidad de reconocer y hacer frente a las condiciones físicas y químicas estresantes de un ambiente específico (Santos *et al.*, 2010); 2) el polímero puede haber afectado la viabilidad o liberación de células. Esto se observó en

ways: root biomass and shoot length. Surprisingly, we observed no effects on seed germination. This may suggest that a possible interaction of the polymer-based matrix with substrate or soil where seeds were deposited for germination could have affected the germination process and consequently the establishment of an ideal niche for the PGPM (Bashan *et al.*, 2014). For these types of studies the soil, environmental conditions and seed characteristics must be taken into account when establishing the seeds that were coated with a polymer-based PGPM (Farnsworth, 2000). Even though we found no effect of the polymer-based encapsulation of PGPM on seed germination endpoints evaluated by this study, other aspects of seed germination might have received the benefits, such as increased seed viability under storage (Sivakumar *et al.*, 2014).

As for our last question regarding the influence of the hardener and gum on the performance of polymer-based encapsulated PGPM, in both cases, concentrations of 2 % had clear trends of positive effects. The encapsulation of PGPM protects them from mechanical stress and harsh environmental conditions, like pH, dryness and UV (Mortazavian *et al.*, 2007). However, when the concentrations of the hardener or the polymeric gum are inappropriate, the release and viability of the microorganisms are compromised, which in turn significantly affects the colonization of the rhizosphere by the PGPM (John *et al.*, 2011).

CONCLUSIONS

Our analysis of literature about the effects of polymer-based encapsulation on performance of PGPM revealed differential responses in the type of microorganism, plant species, and hardener and gum concentrations evaluated. We detected specific responses for each of these groups, allowing us to describe the most important patterns. The PGPM *Bacillus subtilis* showed a strong positive effect when encapsulated in a polymer-based matrix. Plant species did not show clear pattern of responses, but there was a trend of positive effect in *Triticum* sp., *Vigna radiate* and *Gossypium* sp. Stronger positive responses were detected on root mass and shoot length, but we detected no responses on seed germination. Finally, we found that 2 % concentration for the hardener and the polymeric gum provided significant positive effects when encapsulating PGPM.

estudios donde se evaluaron diferentes tipos de gomas y especies de PGPM (Tittabutr *et al.*, 2007).

También observamos que la respuesta de la PGPM encapsulada basada en polímeros dependió, en cierto grado, de las especies de plantas evaluadas. Sorprendentemente, en la especie *Lycopersicon esculentum*, de la cual hay varios estudios, no hubo efecto positivo después de encapsular PGPM. En este caso, los niveles de germinación influyeron en el crecimiento de las plantas, enmascarando así su efecto positivo tras el metanálisis. Esto ocurre porque durante la germinación de la semilla, la planta requiere una respuesta inmediata de PGPM; pero el inicio de la acción de PGPM encapsulada se retrasa a menudo debido a que la mayoría de las cápsulas poliméricas están diseñadas para una liberación prolongada (Serban *et al.*, 2010).

La diferencia de respuesta entre las especies de plantas puede atribuirse a aspectos de la interacción entre los microorganismos y las raíces de las plantas. Varios estudios señalan la importancia de la asociación de microorganismos a la planta cuando interactúan en la rizósfera (Saharan y Nehra, 2011). Así, la matriz basada en polímeros podría influir en el reconocimiento de microorganismos beneficiosos las raíces de las plantas, ya sea afectando los aspectos fisiológicos de la asociación o el sistema radicular de la planta (Salamoni *et al.*, 2010).

En nuestro análisis también encontramos que con PGPM encapsuladas, el crecimiento de las plantas mejoró en dos aspectos: la biomasa de las raíces y la longitud de los brotes. Sorprendentemente, no observamos efectos sobre la germinación de las semillas. Esto puede sugerir que una posible interacción de la matriz basada en polímeros con el sustrato o el suelo donde las semillas fueron depositadas para la germinación podría haber afectado el proceso de germinación y, por consiguiente, el establecimiento de un nicho ideal para las PGPM (Bashan *et al.*, 2014). En estos tipos de estudios se debe considerar el suelo, las condiciones ambientales y las características de las semillas al usar semillas recubiertas con PGPM de base polimérica (Farnsworth, 2000). Aunque no encontramos efecto de la encapsulación polimérica de PGPM en los puntos extremos de germinación evaluados en este estudio, otros aspectos de la germinación de la semilla podrían haberse beneficiado, como la mayor viabilidad de las semillas por su almacenamiento (Sivakumar *et al.*, 2014).

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank PROMEP-SEP for the postdoctoral scholarship to JPA (Document No. PROMEP/103.5/13/4719).

LITERATURE CITED

- Ahemad, M., and M. Kibret. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J. King Saud Univ. Sci.* 26: 1-20.
- Bashan, Y., J. P. Hernandez, L. A. Leyva, and M. Bacilio. 2002. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biol. Fertil. Soils.* 35: 359-368.
- Bashan, Y., L. E. de-Bashan, S. R. Prabhu, and J. P. Hernandez. 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulation and practical perspectives (1998-2013). *Plant Soil.* 378: 1-33.
- Belman, D., and P. Wolfson. 2014. The New Minimum Wage Research. *Employment Research.* 21: 4-5.
- Bhardwaj, T., R., M. Kanwar, R. Lal, and A. Gupta. 2000. Natural gums and modified natural gums as sustained-release carriers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 26: 25-38.
- Butler, J., M. P. D. Garratt, and S. R. Leather. 2012. Fertilisers and insect herbivores: a meta-analysis. *Ann. Appl. Biol.* 161: 223-233.
- Cappellari, L., R., M. V. Santoro, F. Nievas, W. Giordano, and E. Banchio. 2013. Increase of Secondary metabolite content in marigold by inoculation with plant growth-promoting Rhizobacteria. *Appl. Soil Ecol.* 70: 16-22.
- El-Katatny, M. 2010. Enzyme production and nitrogen fixation by free, immobilized and coimmobilized inoculants of *Trichoderma harzianum* and *Azospirillum brasilense* and their possible role in growth promotion of tomato. *Food Technol. Biotechnol.* 48: 161-174.
- Farnsworth, E. 2000. The ecology and physiology of viviparous and recalcitrant seeds. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 31: 107-138.
- Fragkos K., C., M. Tsagris, and C. C. Frangos. 2014. Publication bias in Meta-Analysis: Confidence intervals for Rosenthal's fail-safe number. *Int. Sch. Res. Notices.* doi:10.1155/2014/825383
- García G., K., V. H. Poggio, G. F. Esparza, R. J. Ibarra, and C. J. Barrera. 2011. Small microcapsules of crystal proteins and spores of *Bacillus thuringiensis* by an emulsification/internal gelation method. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 34: 701-708.
- Guo, L., Z. Wu, A. Rasool, and C. Li. 2012. Effects of free and encapsulated co-culture bacteria on cotton growth and soil bacterial communities. *Eur. J. Soil Biol.* 53: 16-22.
- Gupta, A., M. Gopal, and K. V. Tilak. 2000. Mechanism of plant growth promotion by Rhizobacteria. *Indian J. Exp. Biol.* 38: 856-862.
- Gurevitch, J., and L. V. Hedges. 2001. Meta-analysis: combining results of independent experiments. *In*: Scheiner, S. M., and J. Gurevitch (eds). *Design and Analysis of Ecological Experiments*. Oxford University Press, Oxford, England. pp. 347-369.
- Harman, G., E., C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet, and M. Lorito. 2004. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 43-56.
- En cuanto a nuestra última pregunta sobre la influencia del endurecedor y la goma en el rendimiento de la PGPM encapsulada basada en polímeros, en ambos casos las concentraciones de 2 % presentaron señales claras de efectos positivos. La encapsulación de PGPM las protege del estrés mecánico y de condiciones ambientales severas, como pH, sequedad y UV (Mortazavian *et al.*, 2007). Pero cuando las concentraciones del endurecedor o de la goma polimérica son inapropiadas, la liberación y la viabilidad de los microorganismos se comprometen, lo cual afecta significativamente la colonización de la rizósfera por la PGPM (John *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

En nuestro análisis de la literatura acerca de los efectos de la encapsulación basada en polímeros en el rendimiento de PGPM, encontramos respuestas diferenciadas según el tipo de microorganismos, especies de plantas y las concentraciones de endurecedor y de goma evaluados. Detectamos respuestas específicas para cada grupo, permitiéndonos caracterizar los patrones más importantes. La PGPM *Bacillus subtilis* encapsulada en una matriz polimérica mostró un fuerte efecto positivo. Las especies de plantas no mostraron un patrón claro de respuestas, pero hubo una tendencia de efecto positivo en *Triticum* sp., *Vigna radiata* y *Gossypium* sp. Respuestas positivas más sólidas se detectaron en la masa de las raíces y la longitud de los brotes, pero no en la germinación de las semillas. Finalmente, encontramos que 2 % de concentración para el endurecedor y para la goma polimérica tuvo efectos positivos importantes al encapsular PGPM.

—Fin de la versión en Español—

-----*-----

- Hernández S., M., C. F. D. Hernández, M. G. Gallegos, S. R. H. Lira, H. R. Rodríguez, and C. N. Aguilar. 2011. Biocontrol of soil fungi in tomato with microencapsulates containing *Bacillus subtilis*. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* 6: 189-195.
- John, R., P., R. D. Tyagi, S. K. Brar, R. Y. Surampalli, and D. Prévost. 2011. Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Crit. Rev. Biotechnol.* 31: 211-226.

- Kuo, A., A. Kohler, F. M. Martin, and I. V. Grigoriev. 2014. Expanding genomics of mycorrhizal symbiosis. *Front. Microbiol.* 5: 1-5.
- Light, R. J., and D. B. Pillemer. 1984. *Summing Up: The Science of Reviewing Research*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA. 191 p.
- Malusá, E., L. Sas-Paszt, and J. Ciesielska. 2012. Technology for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *Sci World J.* 2012: 1-12.
- Martínez-Viveros, O., M. A. Jorquera, D. E. Crowley, G. Gajardo, and M. L. Mora. 2010. Mechanism and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10: 293-319.
- Mortazavian, A., S. H. Razavi, M. R. Ehsani, and V. S. Sohrab. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iran. J. Biotech.* 5: 1-18.
- Rasband, W. S. 2012. ImageJ. U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
- Rosenberg, M. 2005. The file-drawer problem revisited: a general weighted method for calculating fail-safe numbers in meta-analysis. *Evolution* 59: 464-468.
- Rosenberg, M. S., D. C. Adams, and J. Gurevitch. 2002. MetaWin: statistical software for meta-analysis. Version 2.1. Sinnauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Rosenthal, R. 1991. *Meta-analytic Procedures for Social Research*. Sage, Newbury Park, California, USA. 168 p.
- Saharan B., S., and V. Nehra. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. *Life Sci. Medicine Res.* 21: 1-30.
- Salamoni A., T., M. R. Sierakowski, M. E. Jaziri, and M. Quoirin. 2010. Xyloglucans from *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* seeds affect *Arabidopsis thaliana* seedling growth by enhancing lateral root development. *Rev. Bras. Bot.* 33: 539-545.
- Salas M., M., A., F. M. A. Silva, B. M. G. Cervantes, S. M. T. Rosales, O. M. A. Islas, and F. S. Casas. 2011. The plant growth-promoting fungus *Aspergillus ustus* promotes growth and induces resistance against different lifestyle pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 686-696.
- Santos, S. N., V. N. Kavamura, J. L. Silva, I. S. Melo, and F. D. Andreote. 2010. Plant growth promoter rhizobacteria in plants inhabiting harsh tropical environments and its role in agricultural improvements. In: Maheshwari, D. K. (ed). *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. pp: 251-272
- Serban, F., F. Oancea, O. Siciu, F. Constantinescu, and S. Dinu. 2010. Responsive polymers for crop protection. *Polymer* 2: 229-251.
- Siddiqui, Z. A. 2006. PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 318 p.
- Sivakumar P., K., R. Parthasarathi, and V. P. Lakshmipriya. 2014. Encapsulation of plant growth promoting inoculant in bacterial alginate beads enriched with humic acid. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 3: 415-422.
- Tarrand, J. J., N. R. Krieg, and J. Dobereiner. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24: 967-980.
- Tittabutr, P., W. Payakapong, N. Teamroong, P. W. Singleton, and N. Boonkerd. 2007. Growth, survival and field performance of bradyrhizobial liquid inoculant formulations with polymeric additives. *Sci. Asia* 33: 69-77.
- Vassilev, N., M. Vassileva, R. Azcon, and A. Medina. 2001. Application of free and ca-alginate-entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in a soil-plant system. *J. Biotechnol.* 91: 237-242.
- Yabur, R., Y. Bashan, and G. Hernandez-Carmona. 2007. Alginate from the macro algae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion. *J. Appl. Phycol.* 19: 43-53.

APPENDIX A

- El-Katatny, M. 2010. Enzyme production and nitrogen fixation by free, immobilized and coimmobilized inoculants of *Trichoderma harzianum* and *Azospirillum brasilense* and their possible role in growth promotion of tomato. *Food Technol. Biotechnol.* 48: 161-174.
- Guo, L., Z. Wu, A. Rasool, and C. Li. 2012. Effects of free and encapsulated co-culture bacteria on cotton growth and soil bacterial communities. *Eur. J. Soil Biol.* 53: 16-22.
- Grandlic C., J., M. W. Palmer, and R. M. Maier. 2009. Optimization of plant growth-promoting bacteria-assisted phytostabilization of mine tailings. *Soil Biol. Biochem.* 41: 1734-1740.
- Hernández S., M., C. F. D. Hernández, S. R. H. Lira, and M. G. Gallegos. 2010. Biocontrol de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* sp. con microencapsulados de *Bacillus subtilis* y su efecto en crecimiento y rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Rev. Agraria.* 7: 17-25.
- Jain R., J. Saxena, and V. Sharma. 2010. The evaluation of free and encapsulated *Aspergillus awamori* for phosphate solubilization in fermentation and soil-plant system. *Appl. Soil Ecol.* 46: 90-94.
- Omer, A. M. 2010. Bioformulations of *Bacillus* spores for using as biofertilizer. *Life Sci.* 7: 124-131.
- Rekha P., D., L. Wai-An, A. B. Arun, and Y. Chiu-Chung. 2007. Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CC-FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-pg104 on plant growth under nontoxic conditions. *Bioresour. Technol.* 98: 447-451.
- Saxena J., M. 2011. Efficacy of rhizobacterial strains encapsulated in nontoxic biodegradable gel matrices to promote growth and yield of wheat plants. *Appl. Soil Ecol.* 48: 301-308.
- Vassilev N., M. Vassileva, R. Azcon, and A. Medina. 2001. Application of free and ca-alginate-entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in a soil-plant system. *J. Biotechnol.* 91: 237-242.
- Wu Z., Y. Zhao, I. Kaleem, and C. Li. 2011. Preparation of calcium-alginate microcapsuled microbial fertilizer coating *Klebsiella oxytoca* Rs-5 and its performance under salinity stress. *Eur. J. Soil Biol.* 47: 152-159.
- Young C., C., P. D. Rekha, W. A. Lai, and A. B. Arun. 2006. Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid. *Biotechnol. Bioeng.* 95: 76-83.