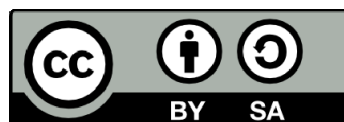




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Desarrollo, estabilidad y eficacia de biofertilizantes para la mejora del cultivo de plantas de tomate y maíz

Miriam Navarro Arenas



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartitqual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartitqual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0. Spain License.**



Desarrollo, estabilidad y eficacia de biofertilizantes para la mejora del cultivo de plantas de tomate y maíz

TESIS DOCTORAL
Miriam Navarro Arenas
Barcelona, 2021



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



Desarrollo, estabilidad y eficacia de biofertilizantes para la mejora del cultivo de plantas de tomate y maíz

Memoria presentada por Miriam Navarro Arenas para optar al grado de doctora por la
Universidad de Barcelona.

Este trabajo se enmarca en el programa de doctorado de Ecología, Ciencias Ambientales y Fisiología Vegetal del Departamento de Biología Evolutiva, Ecología y Ciencias Ambientales (BEECA) de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, juntamente con la empresa Productos Agrícolas Macasa S. L.

El presente trabajo se ha realizado en el Departamento de Biología Evolutiva, Ecología y Ciencias Ambientales (BEECA) de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, bajo la dirección y tutorización de Dr. Sergi Munné Bosch, y en la empresa Productos Agrícolas Macasa S. L., bajo la supervisión de Celia Castañeda Ríos.

Doctoranda



Miriam Navarro Arenas

Director y tutor de tesis

Sergi Munné Bosch

“El papel de lo infinitamente pequeño en la naturaleza es infinitamente grande”

Louis Pasteur

Agradecimientos

Quiero empezar agradeciendo a Productos Agrícolas Macasa y Joan Mateu, y al grupo ANTIOX y Sergi Munné, por permitirme llevar a cabo este proyecto. Aunque, sin duda, han sido muchas las personas que han participado, de una u otra manera, en esta tesis.

Gracias a todos mis compañeros de Macasa, en especial a oficina técnica: A Celia por guiarme, ayudarme y compartir conmigo los triunfos; a Raquel porqué desde el primer día se volcó en ayudarme en este proyecto; a Albert por tantos consejos para mis plantas, tanto las de este proyecto como las de casa; y a Sonia, Judit y Anna por mostrar siempre interés en esta tesis.

Gracias al grupo ANTIOX. A mi director de tesis, Sergi Munné, por guiarme durante toda esta etapa, por enseñarme tanto de un tema nuevo para mí, y sobre todo, por transmitirlo con tanta pasión. Gracias a todos mis compañeros que han vivido esta etapa conmigo: Vero, Alba, Paula, Erola, Marina, Camila, Andrea, Celia y David, gracias por toda la ayuda en todas las etapas de esta tesis y por hacer los días tan divertidos. También, gracias a Maren y Marta, por enseñarme tanto y con tanta paciencia.

Y por supuesto, GRACIAS, así, en mayúscula, a mi familia. A mi madre, mi padre y mi hermano, por haberme apoyado siempre, por haber creído siempre en mí y haberme traído hasta aquí. Porqué siempre me habéis dicho “tu puedes” a cualquier cosa que se me ocurriera, y porque en uno de los momentos clave, David, tú me escribiste: “Aquí siempre te estaremos esperando con el mismo orgullo que el primer día”.

Además, la gran suerte de tener una familia tan grande es que no acabaría de agradecer. Gracias a mis primos y mis tíos, que se que siempre estarán ahí. Y sin duda, gracias a mis abuelos, por tantas horas increíbles, y porque sé exactamente lo que me diríais un día como hoy. Y a mi primo Pablo, siempre creíste en mí y como dije, y sin duda vuelvo a decir, parte de cada uno de mis triunfos te pertenecerá.

Esto no acaba aquí, le toca a la familia que uno elige, esos amigos sin los que ya no me imagino la vida. Laia, Marta y Anita, no sé cuantos años son ya, nos hemos visto crecer y pasar mil etapas. En esta etapa, como en todas, habéis estado “al pie del cañón”. No

sé qué haría sin nuestras quedadas, sin todos los planes que hemos hecho y sin todo el apoyo. Laia, que decir, dos años aguantándome a diario, un confinamiento entero y casi una tesis. Marta, desde un “treball de recerca” hasta aquí, como ha pasado el tiempo, pero sea en la etapa que sea lo importante es tenernos. Anita, tantos años de compartir tanto, tantas horas de planear viajes y de esas “cosas no importantes”. ¡GRACIAS a las tres!

Gema, no me olvido de ti, una de las pocas amistades que se, seguro, que la distancia no puede cambiar. Estés donde estés del planeta, donde yo esté, siempre tendrás tu casa. Gracias por el apoyo en todos estos años.

Marc, que gran suerte contar contigo. Gracias, por el apoyo, por compartir conmigo los triunfos y caídas y vivir conmigo la montaña rusa que a veces es la vida, pero, sobre todo, gracias por el día a día.

A todos los que habéis formado parte de esta etapa, y de tantas otras, ¡GRACIAS!

ABSTRACT

El aumento de la población mundial en las últimas décadas, junto con la disminución de las tierras cultivables, ha puesto de manifiesto la necesidad de aumentar la producción agrícola para satisfacer la creciente demanda de alimentos de la población. Además, los fertilizantes químicos, utilizados en exceso, conllevan un uso excesivo de recursos limitados del planeta y una contaminación ambiental. En este sentido, el uso de microorganismos en agricultura ha demostrado ser beneficioso, reduciendo estas problemáticas y mejorando el crecimiento de los cultivos. Por estos motivos, el presente estudio tiene como objetivo el desarrollo y ensayo de biofertilizantes, definidos como insumos con una o varias especies de microorganismos, que aplicados a los cultivos mejoran la absorción de nutrientes, proveen de fitohormonas y/o regulan fitohormonas relacionadas con el crecimiento vegetal. Para ello, primeramente se ensayaron tres microorganismos en plantas de tomate, y se demostró la eficacia de *Pseudomonas* [REDACTED] como bacteria promotora del crecimiento vegetal, *Azotobacter* [REDACTED] como bacteria fijadora de nitrógeno, y *Bacillus* [REDACTED] como microorganismo solubilizador de fósforo. Por este motivo, se formularon tres fertilizantes sólidos: Fertilizante 6-4-4 con mezcla de microorganismos, fertilizante P30 con *B.* [REDACTED] y fertilizante N7 con *A.* [REDACTED]. Por otro lado, se formularon tres biofertilizantes líquidos: Materia orgánica con mezcla de microorganismos, Superamino (basado en aminoácidos) con mezcla de microorganismos y Vegtop (basado en materia orgánica y aminoácidos) con mezcla de microorganismos. En los biofertilizantes sólidos, la reducción de la humedad demostró estabilizar los microorganismos incorporados en los formulados durante un año. Por otro lado, los microorganismos incorporados en los formulados líquidos fueron estables cuando se adicionó [REDACTED] como protector celular. Por último, los biofertilizantes obtenidos se ensayaron en cultivos. Los fertilizantes 6-4-4 con mezcla de microorganismos y P30 con *B.* [REDACTED] mostraron un aumento de la producción en plantas de tomate, independientemente de la dosis. Por otro lado, el fertilizante N7 con *A.* [REDACTED] consiguió un aumento de nitratos en el suelo cuando se ensayó en maíz. Además, el fertilizante de materia orgánica con mezcla de microorganismos en plantas de tomate fue el más eficaz, aumentando el rendimiento del cultivo y la calidad de los frutos. Los resultados obtenidos en los diferentes estudios demuestran que, por un lado, los formulados desarrollados mantienen la viabilidad de los microorganismos durante un año, y además, estos son efectivos en el cultivo de plantas de tomate, aumentando el rendimiento del cultivo y/o mejorando la calidad del fruto.

ÍNDICE

ABREVIACIONES	1
INTRODUCCIÓN	3
1. Nutrición en cultivos	5
1.1. Fertilidad en suelos y cultivos	5
1.2. Nutrientes	5
1.2.1 Ciclo biogeoquímico del nitrógeno	9
1.2.2 Ciclo biogeoquímico del fósforo	10
2. Fertilizantes	11
2.1. Fertilizantes inorgánicos	12
2.2. Fertilizantes orgánicos	13
2.3. Fertilizantes órgano-minerales.....	13
2.4. Otros fertilizantes y productos especiales	14
3. Biofertilizantes	14
3.1. Microorganismos y su uso en agricultura	16
3.1.1. Fijadores de nitrógeno.....	17
3.1.2. Solubilizadores de fósforo	18
3.1.3. Microorganismos promotores del crecimiento vegetal.....	19
3.1.4. Otros microorganismos beneficiosos en agricultura	20
3.2. Desarrollo y estabilidad de biofertilizantes	22
4. Interés ambiental de los biofertilizantes.....	24
5. Interés comercial de los biofertilizantes	26
6. El cultivo de plantas de tomate y maíz como modelos de estudio	26
OBJETIVOS	29
CAPÍTULO 1: SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS PARA SU USO COMO	
BIOFERTILIZANTES	33
1. Introducción.....	35
2. Métodos	38
3. Resultados	40
4. Discusión.....	42
5. Conclusión	45
CAPÍTULO 2: FORMULADO DE BIOFERILIZANTES Y ESTABILIDAD DE	
MICROORGANIMOS	47

1. Introducción.....	49
2. Métodos	51
3. Resultados	53
4. Discusión.....	56
5. Conclusión	59
CAPÍTULO 3: ENSAYOS AGRONÓMICOS DE LOS BIOFERTILIZANTES DESARROLLADOS	61
1. Introducción.....	63
2. Métodos	65
3. Resultados	69
4. Discusión.....	74
5. Conclusión	78
DISCUSIÓN GENERAL	79
1. Aspectos fundamentales del desarrollo de biofertilizantes.....	81
1.1. Selección de microorganismos.....	82
1.2. Formulado y estabilidad el biofertilizante	83
1.3. Ensayos agronómicos de los biofertilizantes	85
2. Tipos de biofertilizantes y efectividad en planta de tomates	86
3. Biofertilizantes y reducción de fertilizantes químicos	88
4. Microorganismos beneficiosos en agricultura: Relación entre efecto y disponibilidad de nutrientes en el medio.....	91
CONCLUSIONES	95
BIBLIOGRAFÍA	99
Anexo 1: Nanofertilizer use for sustainable agriculture: Advantages and limitations	127
Anexo 2: Reduced phosphate availability improves tomato quality through hormonal modulation in developing fruits.....	120

ABREVIACIONES

ACC: Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico

IAA: Ácido indol-3-acético

PGPM: Microorganismos promotores del crecimiento vegetal

PGRs: Sustancias promotoras del crecimiento vegetal

TA: Acidez titulable

TSS: Azúcares solubles totales

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Nutrición en cultivos

1.1. Fertilidad en suelos y cultivos

La fertilidad del suelo se define como la capacidad del suelo para suministrar nutrientes esenciales y agua en cantidades y proporciones adecuadas para el crecimiento y la reproducción de las plantas en ausencia de sustancias tóxicas que puedan inhibir su crecimiento (FAO, 2020). La fertilidad de un suelo está determinada por la suma de todas sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Algunas de las propiedades físicas que caracterizan un suelo son la estructura, la porosidad o compactación, la densidad, la capacidad de retención de agua o el contenido de agua. Por otro lado, las propiedades químicas más importantes en un suelo son el pH, la conductividad eléctrica, la capacidad de transformación de nutrientes, la salinidad o la capacidad de intercambio catiónico. Por último, también son esenciales las propiedades biológicas, como la diversidad y abundancia de microorganismos en el suelo, que condicionan el ciclo biogeoquímico de los nutrientes, o la descomposición de la materia orgánica (Patzel et al., 2000; Shrivastav et al., 2020). Las propiedades físicas, químicas y biológicas están relacionadas entre ellas. De esta manera, por ejemplo, la compactación (propiedad física) y el gradiente de oxígeno (propiedad química) condicionan la actividad microbiológica (propiedad biológica) (König et al., 2020). Las propiedades del suelo son difíciles de modificar, pero el estudio de todas ellas es importante, dado que gracias al conocimiento de la fertilidad del suelo y de los requerimientos del cultivo se mejora el manejo de la nutrición y el correcto uso de los fertilizantes.

1.2. Nutrientes

De la misma manera que el estudio de la fertilidad del suelo es fundamental, también es esencial conocer los requerimientos nutricionales de los cultivos, que son específicos de cada planta. Cada cultivo posee un rango óptimo para cada nutriente, por debajo del cual las plantas presentan síntomas de deficiencia de nutrientes. Esto es

debido a la falta de nutrientes que poseen funciones esenciales durante el desarrollo de la planta (Sainju et al., 2003). De la misma manera, un exceso de nutrientes también puede provocar un crecimiento deficiente de los cultivos debido a la toxicidad de estos. De manera que, una cantidad inadecuada de nutrientes perjudica el crecimiento de los cultivos y puede provocar la reducción del rendimiento del cultivo o de la calidad de los frutos (Sainju et al., 2003; Zhu et al., 2017).

Asimismo, un exceso de nutrientes en suelos, aportados a través de fertilizantes químicos, deriva en una toxicidad ambiental. Esto es debido a que los nutrientes en exceso, que no son absorbidos por las plantas, pueden filtrarse en forma de lixiviados. Estos lixiviados contaminan aguas subterráneas y provocan una eutrofización del ambiente. Estos efectos, derivados del uso excesivo de fertilizantes, disminuyen la fertilidad de los suelos, comprometiendo la eficiencia de las tierras cultivables. Por estos motivos, es esencial tener en cuenta las necesidades del cultivo, por tal de no aportar nutrientes en exceso y aportarlos de forma respetuosa con el medio ambiente (Ju et al., 2007; Savci, 2012).

Además de la concentración de los nutrientes requeridos por el cultivo, es fundamental que estos nutrientes se encuentren disponibles, es decir, en la forma asimilable por la planta. Sin embargo, los nutrientes en el suelo tienden a fijarse o inmovilizarse, de forma que se encuentran en formas no asimilables por las plantas. Por ejemplo, el fósforo en el suelo suele encontrarse en forma de fósforo orgánico o inorgánico insoluble, y únicamente un 1% del fósforo se encuentra en forma soluble. En este sentido, la concentración de este nutriente puede ser elevada en el suelo, a pesar de que este no se encuentra disponible para las plantas (Bünemann, 2015). Los nutrientes pueden encontrarse en mayor o menor medida en formas disponibles dependiendo de factores del suelo como el pH o de la presencia o ausencia de microorganismos capaces de solubilizar estos compuestos (Lucas & Davis, 1961).

Los nutrientes esenciales para el crecimiento de los cultivos se dividen en macronutrientes, necesarios en grandes concentraciones para el crecimiento de las plantas, y micronutrientes, necesarios en concentraciones inferiores (Sainju et al., 2003). Los macronutrientes primarios son el nitrógeno, el fósforo y el potasio. Por un lado, el nitrógeno juega un papel fundamental en la síntesis de varios componentes de las células vegetales, ya que es un componente esencial de ácidos nucleicos, proteínas,

fosfolípidos y aminoácidos. Además, es necesario para la síntesis de otros compuestos como coenzimas, pigmentos fotosintéticos y metabolitos secundarios (Ohyama, 2010). Por estos motivos, la deficiencia de nitrógeno puede inhibir el crecimiento general de las plantas. Inicialmente, la deficiencia de este nutriente da lugar a una clorosis o coloración amarilla de las hojas viejas y un menor crecimiento del tallo de la planta. En cultivos como la planta de tomate puede disminuir la producción o tamaño del fruto y la calidad de este. Por otro lado, un exceso de nitrógeno puede promover un crecimiento vegetativo excesivo retrasando el cuaje y maduración de los frutos, provocando una reducción de la producción. Además, las plantas con un exceso de nitrógeno muestran más infecciones por patógenos (Sainju et al., 2003; Parisi et al., 2006; Karthika et al., 2018).

Por otro lado, el fósforo es un elemento principal de las proteínas de membrana, lípidos y ácidos nucleicos. Además, es fundamental en el almacenamiento de energía, ya que es un componente del trifosfato de adenosina, compuesto de fosfato rico en energía crucial en el metabolismo de las plantas. Asimismo, el fósforo estimula el crecimiento de las raíces y está implicado en la producción de las flores (Malhotra et al., 2018). Por consiguiente, una deficiencia de este nutriente provoca diversos síntomas en las plantas. Entre ellos, una coloración verde oscuro y púrpura de las hojas y una senescencia prematura de las hojas viejas. Además, el déficit de fósforo puede provocar un menor crecimiento de cultivos importantes como los tomates, afectando al rendimiento del cultivo. De la misma manera, el exceso de fósforo puede provocar daños indirectos en el crecimiento del tomate, ya que puede disminuir la disponibilidad de micronutrientes como el hierro, zinc, manganeso o cobre (Sainju et al., 2003; Maathuis, 2009; Karthika et al., 2018).

Por último, el potasio posee un rol importante en la regulación del potencial osmótico de las células vegetales, a través del control en la apertura y cierre de los estomas. También, participa en la activación de enzimas involucradas en la respiración y la fotosíntesis (Jaiswal et al., 2016). De esta manera, la deficiencia de potasio aparece como una clorosis marrón del borde de las hojas viejas, que posteriormente se arrugan. En el tomate puede provocar una maduración desigual en los frutos. Por otro lado, el exceso de potasio no tiene un efecto directo sobre los frutos, sin embargo puede reducir la disponibilidad de magnesio, resultando en una deficiencia de este nutriente (Sainju et al., 2003; Maathuis, 2009; Karthika et al., 2018).

Seguidamente, se encuentran los macronutrientes secundarios, que son el calcio, el magnesio y azufre. El calcio juega un papel crucial en la síntesis de la pared celular, proporcionando rigidez. Además, participa en la formación del huso mitótico durante la división celular y en la activación de ciertas enzimas (Maathuis, 2009; Karthika et al., 2018). La deficiencia de calcio, en la planta de tomate, se observa en la podredumbre apical de los frutos (Sainju et al., 2003). Por otro lado, los iones de magnesio actúan en la activación de enzimas que participan en la síntesis de ácidos nucleicos, la respiración y la fotosíntesis. Al mismo tiempo, el magnesio es un componente de la clorofila y las pectinas (Maathuis, 2009; Karthika et al., 2018). La deficiencia de magnesio da lugar a una clorosis de las hojas y desarrollo de aéreas necróticas (Sainju et al., 2003). Por último, el azufre es un componente de algunos aminoácidos esenciales para el metabolismo (Maathuis, 2009; Karthika et al., 2018). Su deficiencia provoca una clorosis con venas de color púrpura en las hojas, que puede progresar a manchas púrpura y zonas necróticas (Sainju et al., 2003).

Finalmente, para el correcto desarrollo de las plantas también son esenciales los siguientes micronutrientes:

- Boro: Está involucrado en la síntesis de la pared celular y su lignificación, y en procesos de respiración, diferenciación de tejidos y síntesis de proteínas (Tripathi et al., 2015; Karthika et al., 2018).
- Hierro: Participa en procesos como la respiración celular, el transporte de oxígeno o la fotosíntesis. También está implicado en la síntesis de clorofila (Tripathi et al., 2015; Karthika et al., 2018).
- Zinc: Es un componente de enzimas y proteínas, entre ellas enzimas que participan en la regulación de la transcripción del ADN a ARN (Tripathi et al., 2015; Karthika et al., 2018).
- Manganeso: Actúa como cofactor de enzimas antioxidantes, de manera que está implicado en la tolerancia al estrés. Además, es un componente de proteínas y enzimas fotosintéticas (Tripathi et al., 2015; Karthika et al., 2018).
- Molibdeno: Está implicado en la asimilación de nitrógeno, ya que es un componente estructural de la enzima nitrogenasa (Tripathi et al., 2015; Karthika et al., 2018).
- Cobre: Es un cofactor de varias enzimas y proteínas, de manera que está implicado en la respiración mitocondrial y la fotosíntesis. Además, participa en la síntesis de la pared celular (Tripathi et al., 2015; Karthika et al., 2018).

1.2.1 Ciclo biogeoquímico del nitrógeno

El nitrógeno es el nutriente mineral más abundante en las plantas. Este nutriente es utilizado en la síntesis de aminoácidos, que posteriormente forman proteínas y ácidos nucleicos. Además, es un componente de la clorofila, pigmento fundamental en la fotosíntesis (Ohyama, 2010). Debido al gran requerimiento de los cultivos de este nutriente y su papel esencial en su desarrollo, es un nutriente limitante en la agricultura. La fuente principal de nitrógeno para las plantas en el medio ambiente proviene del nitrógeno atmosférico (N_2). Sin embargo, las formas de nitrógeno disponibles o asimilables por las plantas son el ion nitrato (NO_3^-) o el ion amonio (NH_4^+) (Dodds & Whiles, 2010; McGrath et al., 2014). De esta manera, el ciclo biogeoquímico del nitrógeno se inicia con la fijación del nitrógeno atmosférico a amonio (Fig. 1). Este proceso lo llevan a cabo las bacterias fijadoras de nitrógeno a través de la llamada fijación biológica del nitrógeno o amonificación. Las bacterias fijadoras de nitrógeno son capaces de sintetizar enzimas nitrogenasa que son las responsables de catalizar este proceso (Herridge & Peoples, 2008). Por otro lado, la fijación de N_2 también puede darse, en menor medida, por deposición de óxidos de nitrógeno formados por descargas eléctricas o combustión a altas temperaturas. Seguidamente, el amonio puede sufrir una conversión a nitrato mediante la nitrificación. Este proceso consta de dos pasos, ambos mediados por bacterias nitrificantes. En el primer paso el amonio es oxidado a nitrato (NO_2) y en el segundo, el NO_2 es oxidado a NO_3^- . De esta manera, las plantas pueden asimilar el amonio

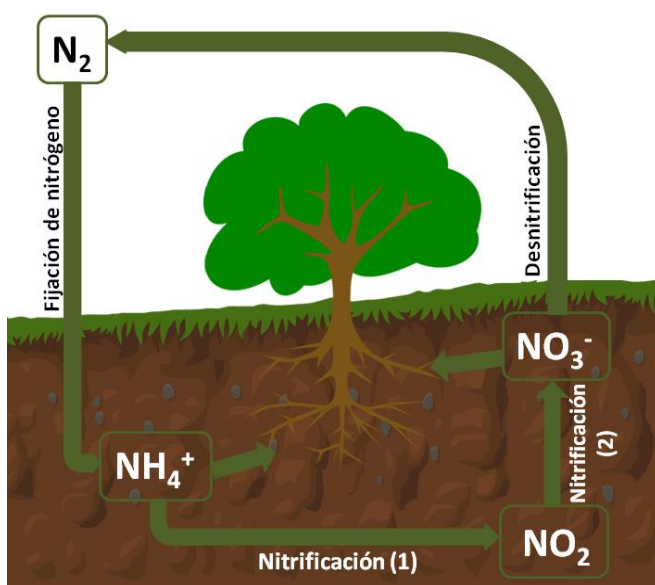


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno

resultante de la fijación de nitrógeno o el nitrato obtenido de la nitrificación (Peng & Zhu, 2006; Hayatsu et al., 2008). Además, los nitratos del suelo no utilizados por las plantas pueden sufrir un proceso de desnitrificación, en el cual, a través de varias transformaciones el nitrato vuelve a la forma N_2 atmosférica. Por último, el NO_3^- no utilizado por las plantas, también puede filtrarse

en forma de lixiviado a aguas subterráneas. Por otro lado, el amonio también puede obtenerse a través de la mineralización, definida como la conversión de nitrógeno orgánico en formas inorgánicas. De forma contraria, a través de la inmovilización, el nitrógeno inorgánico puede transformarse en nitrógeno orgánico (Zhang et al., 2020).

1.2.2 Ciclo biogeoquímico del fósforo

El fósforo es un macronutriente primario involucrado en muchos procesos metabólicos en las plantas, y es un componente principal de proteínas de membrana, lípidos y ácidos nucleicos. Además, el fósforo tiene un rol esencial en el almacenamiento y transferencia de energía, ya que es un componente del trifosfato de adenosina. Por estos motivos, este nutriente es esencial para el crecimiento de las plantas (Malhotra et al., 2018). El fósforo en el suelo puede encontrarse en tres formas principales: Forma soluble, insoluble inorgánica o insoluble orgánica. De las tres formas mencionadas, únicamente las formas solubles son asimilables por las plantas, que generalmente se encuentra en forma de ion fosfato de dihidrógeno (H_2PO_4^-) o ion fosfato de hidrógeno (HPO_4^{2-}) (Schachtman et al., 1998; Shen et al., 2011). No obstante, la mayoría de fósforo presente en el suelo se encuentra en forma insoluble orgánica o inorgánica, de manera que menos del 1% del fósforo está disponible para las plantas (Bünemann, 2015). El fósforo orgánico se encuentra formando parte de inositol, fosfolípidos y ácidos nucleicos de organismos del suelo. Mientras que el fósforo inorgánico, generalmente se encuentra en minerales como la apatita, un fosfato de calcio muy poco soluble.

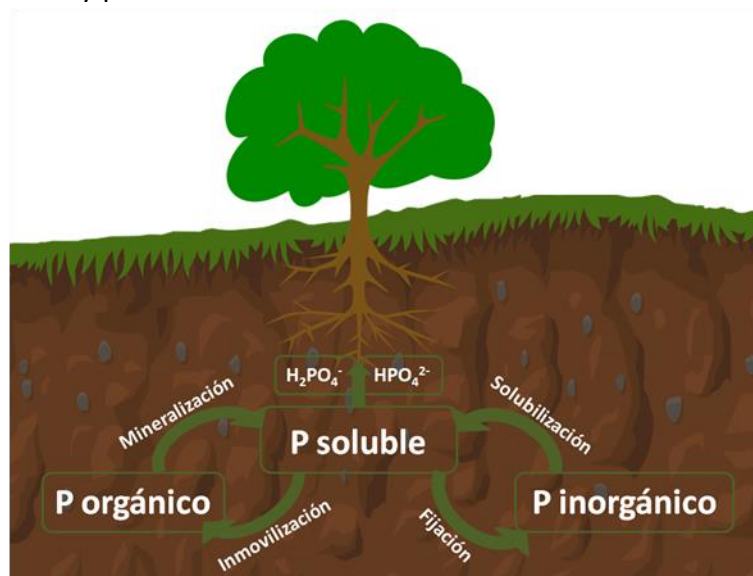


Figura 2. Ciclo biogeoquímico del fósforo

Además de la apatita, el fósforo también puede formar minerales en combinación con el hierro, el aluminio o el manganeso (Kishore et al., 2015). Gracias a la acción de ciertos microorganismos el fósforo insoluble puede transformarse en formas solubles. El fósforo inorgánico, puede solubilizarse gracias a la acción de microorganismos solubilizadores de fósforo, dando lugar a formas solubles y disponibles para las plantas (Fig. 2). Además, el fósforo orgánico también puede sufrir una conversión a formas solubles a través de la mineralización, mediada igualmente por microorganismos (Rodríguez & Fraga, 1999). Por otro lado, el fósforo soluble, generalmente aplicado a través de fertilizantes, también puede ser transformado en fósforo insoluble orgánico a través del proceso denominado inmovilización, o en fósforo insoluble inorgánico a través de la fijación (Arai & Livi, 2013). El fósforo soluble no utilizado por la planta, y no inmovilizado o fijado, puede filtrarse a través de la lixiviación, provocando una contaminación de aguas subterráneas (Ruttenberg, 2003).

2. Fertilizantes

Los fertilizantes se describen como cualquier material sólido o líquido, natural o fabricado, que se agrega al suelo para suministrar uno o más nutrientes esenciales para el desarrollo y crecimiento adecuados de una planta, es decir, son productos que mejoran los niveles de nutrientes y/o propiedades químicas y físicas del suelo, mejorando el crecimiento, rendimiento y calidad del cultivo (Gowariker et al., 2008).

Los fertilizantes pueden clasificarse según su composición química, su contenido en nutrientes, su estado físico o su modo de aplicación. Según su composición química, los fertilizantes se clasifican en fertilizantes inorgánicos o minerales, fertilizantes orgánicos y fertilizantes órgano-minerales. Por otro lado, según su contenido de nutrientes, los fertilizantes se pueden dividir en fertilizantes simples y fertilizantes compuestos o complejos. Además, teniendo en cuenta su estado físico, podemos diferenciar fertilizantes sólidos y líquidos. Por último, existen fertilizantes de suelo o foliares, dependiendo de su modo de aplicación (Real Decreto 506/2013).

La clasificación más utilizada de los abonos es aquella que hace referencia a su composición y contenido de nutrientes. De esta manera, según el Real Decreto 506/2013, que regula el uso de fertilizantes en España, podemos dividir los abonos en:

Grupo 1. Abonos inorgánicos

Grupo 2. Abonos orgánicos

Grupo 3. Abonos órgano-minerales

Grupo 4. Otros abonos y productos especiales

Tanto en los abonos inorgánicos, como en los abonos orgánicos u órgano-minerales, los fertilizantes pueden dividirse en abonos simples o compuestos. Los abonos simples, son aquellos formados por un solo nutriente. En este sentido, los tres nutrientes principales que forman estos abonos son el nitrógeno, el fósforo y el potasio, ya que son los tres macronutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas. Sin embargo, también existen abonos minerales simples basados en otros nutrientes secundarios, como el calcio o el magnesio. Por otro lado, los abonos compuestos son los que están formados por dos o más nutrientes. En este caso, los más comunes son los formados por combinaciones de los tres macronutrientes primarios. Pero también podemos encontrar abonos formados por combinación de estos con nutrientes como el calcio, el magnesio, el azufre, boro, cobre, hierro, manganeso, molibdeno y/o zinc (Gowariker et al., 2008; Real Decreto 506/2013).

2.1. Fertilizantes inorgánicos

Un abono inorgánico, o también denominado abono mineral, es aquel obtenido mediante extracción o mediante procedimientos industriales de carácter físico o químico, cuyos nutrientes se presentan en forma mineral (Real Decreto 506/2013). Los fertilizantes minerales son una de las principales fuentes de nutrientes para los cultivos hoy en día. Estos abonos se introdujeron en el siglo XX, implicando un aumento significativo de la producción agrícola. Sin embargo, poseen ciertas limitaciones, ya que un exceso de estos fertilizantes conlleva diversas problemáticas, como son la lixiviación de nutrientes, la contaminación de las aguas subterráneas e incluso una reducción de la fertilidad del suelo a largo plazo (Ju et al., 2007; Savci, 2012; Basosi et al., 2014).

2.2. Fertilizantes orgánicos

Los fertilizantes orgánicos son aquellos cuya función principal es aportar nutrientes para las plantas, los cuales proceden de materiales carbonados de origen animal o vegetal (Real Decreto 506/2013). El uso de fertilizantes orgánicos posee varias ventajas. Por un lado, se elaboran a partir de residuos de origen animal o vegetal, de modo que se transforma un residuo en una fuente de nutrientes apta para la agricultura. De esta manera, se potencia la economía circular, aumentando el valor económico de los materiales de desecho y reduciendo la posible contaminación derivada de estos. Además, el uso de abonos orgánicos, mejora la fertilidad y calidad del suelo, dado que influye en características del suelo como la agregación o la formación de la estructura, que mejora la capacidad de retención de agua, entre otros. Por otro lado, estos abonos presentan ciertas limitaciones. El contenido de nutrientes en estos materiales es bajo, por lo que se necesita una cantidad elevada de abonos orgánicos para suministrar suficientes nutrientes al cultivo. Al mismo tiempo, el poder de suministro de nutrientes de estos abonos es lento. Además, el beneficio de los fertilizantes orgánicos depende, en gran medida, de la calidad de la materia utilizada, y usualmente es una materia difícil de estandarizar (Singh, 2012; Verma et al., 2020).

2.3. Fertilizantes órgano-minerales

Un abono órgano-mineral es aquel cuya función principal es aportar nutrientes para las plantas, los cuales son de origen orgánico y mineral, y se obtiene por mezcla o combinación química de abonos inorgánicos con materiales carbonados de origen animal o vegetal o abonos orgánicos (Real decreto 506/2013). Los abonos órgano-minerales poseen las ventajas de ambos tipos de fertilizantes, ya que la fracción orgánica contribuye a la mejora de la fertilidad del suelo, y aportan una concentración elevada de nutrientes, gracias a la fracción mineral. De esta manera, la combinación de fertilizantes minerales y orgánicos, ha demostrado mejorar el rendimiento de los nutrientes aportados, como el nitrógeno, y el rendimiento de los cultivos (Satyanarayana et al., 2002; Kramer et al., 2002; Kumar et al., 2019).

2.4. Otros fertilizantes y productos especiales

Los fertilizantes más comunes son los minerales, orgánicos u órgano-minerales. Sin embargo, existen varios tipos de abonos menos comunes o productos especiales en investigación. Entre estos productos se encuentran los bioestimulantes, definidos como productos o materias que contienen sustancias y/o microorganismos, cuya función es estimular los procesos naturales de las plantas o la rizosfera mejorando la absorción de nutrientes, eficiencia en el uso de los mismos o tolerancia al estrés abiótico (Du Jardin, 2015). En esta categoría se encuentran los aminoácidos o hidrolizados proteicos, los extractos de algas, los ácidos húmicos o los productos basados en microorganismos, también llamados biofertilizantes. Estos productos, se encuentran en el grupo 4 del Real Decreto 506/2013, y son algunos de los abonos que están actualmente en expansión, ya que han aumentado su demanda comercial en los últimos años (Battacharyya et al., 2015; Wang et al., 2019).

Además, otros fertilizantes se encuentran en proceso de investigación y desarrollo, este es el caso de los nanofertilizantes, que son nutrientes encapsulados/recubiertos con nanomaterial para la liberación lenta y controlada de uno o más nutrientes, con el fin de satisfacer los requerimientos de nutrientes de las plantas (Anexo 1).

3. Biofertilizantes

El concepto de biofertilizantes ha sido descrito de diversas formas según varios autores. Se podrían describir como sustancias que contienen uno o más microorganismos vivos, que al aplicarlos a las plantas, promueven su crecimiento aumentando la disponibilidad de nutrientes y/o produciendo o regulando sustancias promotoras del crecimiento vegetal (PGRs). De esta manera, los biofertilizantes están formados por microorganismos beneficiosos para los cultivos y otras sustancias o portadores. Los microorganismos actúan principalmente en la conversión de nutrientes no disponibles en formas asimilables por la planta, a través de su actividad metabólica (Franche et al., 2008; Sharma et al., 2016; Billah et al., 2019). Por su lado, las sustancias portadoras hacen posible la formulación de los biofertilizantes de manera que estos sean estables por un periodo largo de tiempo y ayuden a potenciar el efecto de los microorganismos en los cultivos (Vessey et al., 2003; Malusá et al.

2012; Reddy et al., 2020). Los biofertilizantes presentan diversas ventajas en comparación con los fertilizantes clásicos. Primeramente, gracias al uso de microorganismos podemos reducir la cantidad de fertilizantes químicos aplicados a los cultivos, que en exceso pueden comportar una reducción de la fertilidad del suelo y contaminación ambiental. En este sentido, se ha observado que los cultivos únicamente son capaces de utilizar del 10 al 40% de los nutrientes aplicados, de manera que del 60 al 90% se pierde por inmovilización, lixiviación o volatilización (Adesemoye & Kloepper, 2009). Por este motivo, el uso de microorganismos es de gran utilidad para mejorar la disponibilidad de nutrientes en formas asimilables para los cultivos. De esta manera, se consigue una mejor eficiencia de los nutrientes y, por tanto, permite reducir la cantidad de nutrientes a aplicar, que generalmente son un recurso limitado. Además, se reduce la posible contaminación del suelo y aguas derivada de los nutrientes residuales (Ju et al., 2007). Al mismo tiempo, los biofertilizantes mejoran la fertilidad del suelo, ya que los microorganismos, a través de su actividad metabólica aportan componentes útiles tanto para las plantas como para otros microorganismos (Franche et al., 2008; Sayyed et al., 2013; Sharma et al., 2016). De esta manera, aumenta la biodiversidad del suelo y esto implica una mejora en la fertilidad. Asimismo, el uso de biofertilizantes reduce el uso de fuentes limitadas de nutrientes, y la huella de carbono que resulta de su uso es menor que la huella de carbono resultante de fertilizantes químicos (Gong et al., 2020). Además, es respetuoso con el medio ambiente, haciendo que sean muy útiles en agricultura ecológica, ya que en este tipo de agricultura la cantidad y tipo de fertilizantes que pueden utilizarse es reducida. En este caso, los microorganismos son de gran utilidad para mejorar la eficiencia de los nutrientes del suelo (Bhardwaj et al., 2014; Thomas & Singh, 2019).

Por otro lado, estos fertilizantes tienen ciertas limitaciones. Dado que se trata de organismos vivos, la vida útil de estos productos suele ser más corta que la vida útil de los fertilizantes químicos (Bashan et al., 2013; Herrmann & Lesueur, 2013). Por la misma razón, la efectividad de los microorganismos puede verse afectada por las condiciones climáticas, ya que estos tienen una temperatura, humedad y pH óptimos, en los cuales se encuentran más activos metabólicamente. Si las condiciones ambientales no son favorables, pueden reducir su actividad y consecuentemente la efectividad de este biofertilizante se verá disminuida (Herrmann & Lesueur, 2013;

Malusà et al., 2016). Por último, los biofertilizantes son capaces de reducir la cantidad de nutrientes a aportar a través de fertilizantes químicos, pero no pueden reemplazarlos totalmente (Adesemoye et al., 2009; Dasgan et al., 2012).

3.1. Microorganismos y su uso en agricultura

Los microorganismos beneficiosos en agricultura es un área cada vez más investigada, y por ello en los últimos años se han descubierto varias especies útiles como biofertilizantes. Los microorganismos más utilizados son bacterias u hongos y se pueden clasificar según el efecto que tienen sobre la planta o según la relación microorganismo-planta. En el primer caso, los grupos más estudiados son los microorganismos fijadores de nitrógeno, los solubilizadores de fósforo y los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM). Además, se pueden encontrar microorganismos solubilizadores de potasio, solubilizadores de zinc y quelantes de hierro. Un microorganismo puede poseer una o varias capacidades que los hacen beneficiosos en agricultura, de manera que un mismo microorganismo puede pertenecer a más de uno de los grupos anteriormente citados (Vessey et al., 2003; Thomas & Singh, 2019).

Por otro lado, según la relación entre el microorganismo y la planta podemos dividir los microorganismos en tres grupos, endosimbiontes, endófitos y microorganismos de vida libre. El primer caso, los microorganismos penetran en la raíz y establecen una relación de simbiosis con la planta. Esta relación suele darse en ciertos microorganismos fijadores de nitrógeno, que penetran en la raíz de la planta y forman nódulos. Esta relación es beneficiosa para ambos organismos. Por un lado, el microorganismo mejora la disponibilidad de nutrientes para la planta. A la misma vez, el microorganismo cuenta con un nicho protegido de condiciones climáticas cambiantes, como son la temperatura, la humedad o el pH del suelo. En este caso, es necesario un grado alto de especificidad para que el microorganismo y la planta puedan establecer esta relación (Van & Vanderleyden, 1995; Oldroyd et al., 2011). Por otro lado, los microorganismos endófitos son aquellos que penetran en la raíz de la planta y permanecen en el espacio intracelular, sin necesidad de una relación tan estrecha como los microorganismos endosimbiontes. En este caso, el grado de especificidad disminuye, pero se mantiene elevado. De la misma manera, la protección ante eventos climáticos disminuye ligeramente (Sturz et al., 2000; Compant et al.,

2010; Santoyo et al., 2016). Por último, los microorganismos de vida libre viven en la rizosfera y mantienen una relación poco específica con la planta, de manera que una misma cepa puede ser útil en diversos cultivos. Sin embargo, los microorganismos de vida libre son más sensibles a los cambios en las condiciones del suelo, implicando un menor tiempo de efectividad que aquellas bacterias que establecen una relación más estrecha con la planta, como son los endófitos o endosimbiontes (Lucy et al., 2004).

3.1.1. Fijadores de nitrógeno

El nitrógeno es un nutriente esencial y limitante para el crecimiento vegetal. El mayor reservorio de nitrógeno es la atmósfera, que contiene un 78% de N_2 . Sin embargo, el dinitrógeno es una forma no asimilable por las plantas. Para que el nitrógeno se encuentre en una forma disponible para las plantas es necesaria la transformación de este nutriente por ciertos microorganismos. Los microorganismos están implicados en diversas reacciones del ciclo del nitrógeno en la naturaleza, entre estas transformaciones se encuentra la fijación biológica del nitrógeno (Fig. 4). La fijación biológica del nitrógeno es la transformación del nitrógeno atmosférico en amonio, gracias a la acción de ciertos microorganismos (Herridge & Peoples, 2008; Lehnert et al., 2018). El proceso de fijación del nitrógeno se logra gracias a la acción del complejo enzimático nitrogenasa, compuesto por la dinitrogenasa reductasa y dinitrogenasa. Los electrones son proporcionados por la dinitrogenasa reductasa, y la dinitrogenasa usa los electrones para reducir el N_2 a NH_4^+ (Kuypers et al., 2018).

La capacidad de fijación del nitrógeno la poseen ciertos hongos, bacterias y algunos actinomicetos, y estos microorganismos son denominados diazotróficos (Ramamany et al., 2020). Existen microorganismos diazotróficos endosimbiontes, endófitos y de vida libre. Entre los microorganismos diazotróficos que establecen una relación simbiótica con la planta encontramos la familia *Rhizobiaceae*, que se encuentra generalmente en simbiosis con cultivos de leguminosas. Además, *Frankia*, es un actinomiceto que también tiene la capacidad de establecer relaciones simbióticas con varias plantas leñosas y proporcionarles nitrógeno disponible (Franche et al., 2008). Por otro lado, entre los microorganismos endófitos más comunes están *Acetobacter* y *Azospirillum*. *Acetobacter* pertenece a la familia *Acetobacteraceae* y la especie más conocida como fijadora de nitrógeno es *Acetobacter diazotrophicus* (Sevilla et al., 2001). Por su lado, *Azospirillum* pertenece a la familia *Spirillaceae* y las

especies más utilizadas como fijadores de nitrógeno son *A. lipoferum* y *A. brasilense* (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Por último, entre los microorganismos diazotróficos de vida libre se encuentra *Azotobacter*. Esta bacteria pertenece a la familia *Azotobacteriaceae*, y las especies más conocidas en esta área son *A. chroococcum* y *A. vinelandii* (Bhat et al., 2015). Además, ciertas cianobacterias, como son los géneros *Anabaenay Nostoc*, son útiles como fijadoras de nitrógeno. Dependiendo de la especie, encontramos cianobacterias de vida libre y cianobacterias que mantiene relaciones simbióticas con ciertas plantas (Meeks & Elhai, 2002).

3.1.2. Solubilizadores de fósforo

El fósforo es uno de los macronutrientes esenciales para el crecimiento vegetal, el segundo nutriente más limitante después del nitrógeno. Este nutriente se encuentra presente en muchos suelos. Sin embargo, el fósforo se encuentra principalmente en formas orgánicas e inorgánicas insolubles en el suelo, de manera que no está disponible para las plantas (Bünemann, 2015). Ciertas bacterias y hongos son capaces de transformar estas formas de fósforo en formas solubles (H_2PO_4^- y HPO_4^{2-}), aumentando la disponibilidad de este nutriente para las plantas (Fig. 4). El mecanismo por el cual ciertos microorganismos logran solubilizar el fósforo inorgánico está mediado por la síntesis de ácidos orgánicos, como el ácido glucónico o el ácido cítrico. La liberación de estos ácidos orgánicos al suelo conlleva una reducción del pH y la disolución de los compuestos de fosfato del suelo, que implica la liberación de fósforo en formas asimilables para las plantas (Rodríguez & Fraga, 1999; Gyaneshwar et al., 2002; Billah et al., 2019). Además, algunos microorganismos también son capaces de mineralizar el fósforo orgánico, dando como resultado fósforo soluble. Esta conversión es posible gracias a la producción de enzimas fosfatasa o fitasas no específicas por parte de los microorganismos, que actúan sobre los fosfatos liberando el fósforo en forma soluble (Kishore et al., 2015).

Los hongos más comunes utilizados para solubilizar el fósforo son *Aspergillus* y *Penicillium*. Mientras que las bacterias, denominada bacterias solubilizadoras de fósforo, más utilizadas forman parte del género *Bacillus*, siendo *Bacillus megaterium* la más común. También ciertas especies de la familia *Pseudomonas*, como es *Pseudomonas putida*, han demostrado tener esta capacidad (Arif et al., 2017).

3.1.3. Microorganismos promotores del crecimiento vegetal

Los PGPM, son aquellos que estimulan el crecimiento de la planta directamente a través de la producción de fitohormonas o PGRs. Las fitohormonas o reguladores producidos por microorganismos son: Auxinas, citoquininas, giberelinas y reguladores del etileno (Fig. 3) (Hayat et al., 2010).

En el caso de las auxinas, son fitohormonas implicadas en numerosos procesos del crecimiento de las plantas, como son la estimulación de la expansión celular, iniciación de raíces laterales, elongación de tallo y raíces, diferenciación del tejido vegetal y geotropismo (Teale et al., 2006). Varios microorganismos producen la auxina más abundante, el ácido indol-3-acético (IAA), en general en presencia del precursor triptófano o peptona, aunque existen vías independientes. El 80% de los microorganismos aislados de la rizosfera de varios cultivos tienen la capacidad de producir auxinas como metabolitos secundarios (Khalid et al., 2004). Las auxinas producidas por microorganismos tienen un efecto estimulador del crecimiento vegetal, sobre todo a través del crecimiento de la raíz, aumentando las raíces laterales y la superficie total de raíz. De esta manera aumenta la capacidad de absorción de nutrientes del suelo y la exudación de las raíces, que a su vez estimula aún más la colonización de las raíces por PGPM (Asghar et al., 2002; Spaepen et al., 2011). Algunos microorganismos que pueden producir auxinas son *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas putida*, entre otros (Khalid et al., 2004).

Por otro lado, las citoquininas son fitohormonas que controlan la división celular, el ciclo celular y la diferenciación y estimulan los procesos de desarrollo en las plantas. Ciertos microorganismos son capaces de sintetizar citoquininas (Arkhipova et al., 2007). En este sentido, zeatina ribósido es la principal citoquinina sintetizada por las bacterias. Las citoquininas producidas por microorganismos se ha relacionado con un aumento en el peso de la raíz y los brotes (Arkhipova et al., 2005). Bacterias como *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* o *Proteus vulgaris* son capaces de sintetizar citoquininas (Arkhipova et al., 2005; Karadeniz et al., 2006; Arkhipova et al., 2007).

Las giberelinas también están implicadas en numerosas funciones metabólicas necesarias a lo largo del crecimiento de la planta, en la germinación de la semilla, elongación del tallo, floración y fructificación (Tanimoto, 2005). Se ha detectado la capacidad de sintetizar 4 tipos de giberelinas en bacterias (GA_1 , GA_3 , GA_4 y G_{20}) (MacMillan, 2001). Algunos de los microorganismos en los que se ha detectado producción de giberelinas son *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas monteilii*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus licheniformis* (Janzen et al., 1992; Gutiérrez-Mañero et al., 2001; Pandya & Desai, 2014; Shahzad et al., 2016).

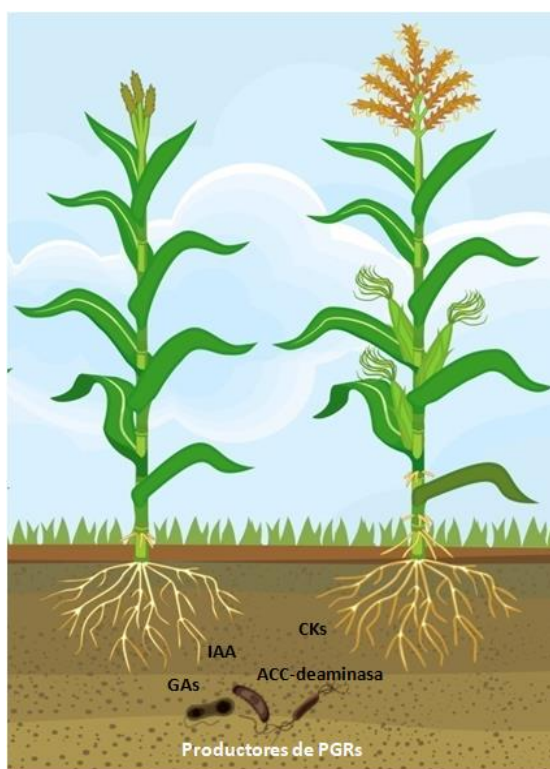


Figura 3. Microorganismos productores de PGRs

Además, otro mecanismo que poseen los PGPM es la regulación de la síntesis de etileno. El etileno está implicado en el crecimiento y la senescencia de las plantas, además de en la respuesta al estrés (Iqbal et al., 2017). Ciertos microorganismos son capaces de regular el etileno, cuyo precursor es el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). El mecanismo de regulación se basa en la síntesis de estos microorganismos de ACC-deaminasa, que puede hidrolizar el ACC, impidiendo su conversión en etileno. Los géneros conocidos que poseen esta capacidad son *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Burkholderia* y *Bacillus* (Glick et al., 1998; Glick et al., 2014).

3.1.4. Otros microorganismos beneficiosos en agricultura

A pesar de que los grupos de microorganismos más comúnmente estudiados y utilizados en agricultura hasta el momento son los anteriormente descritos, existen otros grupos de microorganismos útiles para el crecimiento vegetal por sus características. Entre ellos encontramos los microorganismos solubilizadores de potasio, solubilizadores de zinc y quelantes de hierro. Los solubilizadores de potasio

son microorganismos capaces de solubilizar las formas de potasio no disponible del suelo, de manera que aumentan la disponibilidad de este nutriente para las plantas (Fig. 4) (Sharma et al., 2016). Algunos ejemplos de microorganismos con esta capacidad son *Aspergillus*, *Bacillus mucilaginosus* y *Bacillus edaphicus* (Sheng & He, 2006; Basak et al., 2009; Meena et al., 2014).

Por otro lado, también son útiles los microorganismos capaces de aumentar la disponibilidad de micronutrientes en los cultivos, este es el caso de los microorganismos solubilizadores de zinc. El zinc está implicado en la síntesis de proteínas y el desarrollo de la semilla, entre otros (Tsonev & Lidon, 2012). Sin embargo, parte del zinc que se proporciona al suelo es fijado, permaneciendo en una forma no asimilable por las plantas. Los microorganismos con capacidad de solubilizar el zinc son capaces de transformar esos compuestos en formas asimilables por las plantas, como es el catión Zn^{2+} , que es la forma predominante utilizada por las plantas. Algunas bacterias conocidas con esta habilidad son del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Acinetobacter* (Saravanan et al., 2004; Saravanan et al., 2007; Vaid et al., 2014).

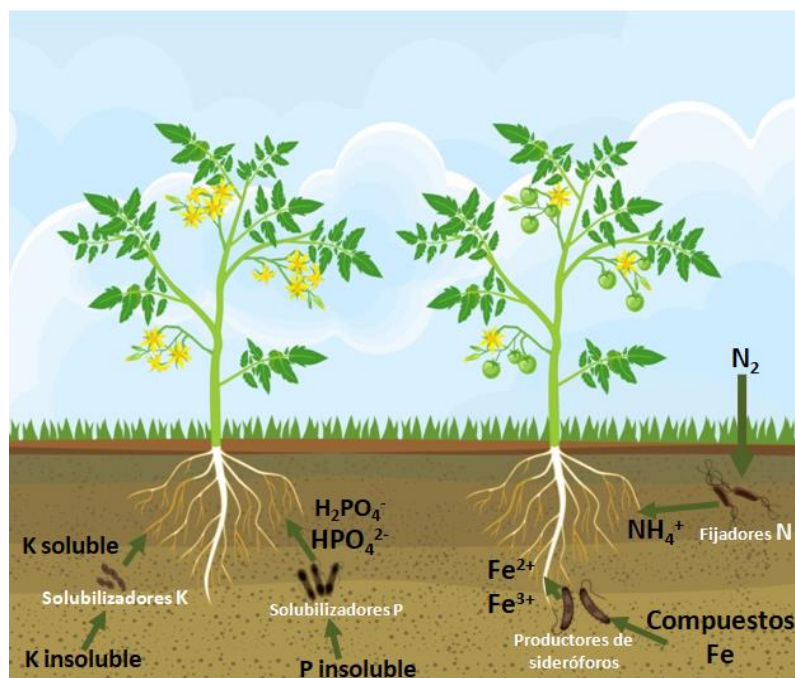


Figura 4. Tipos de microorganismos implicados en la mejora de la disponibilidad de nutrientes para las plantas.

Por último, otro micronutriente impotente en la nutrición de las plantas es el hierro, que participa en la fotosíntesis, la formación de clorofila y la respiración, entre otras. Las plantas pueden asimilar el hierro en forma Fe^{2+} y Fe^{3+} . No obstante, en el

suelo y en un ambiente aeróbico, el hierro suele formar hidróxidos y oxihidróxidos insolubles, de manera que gran parte del hierro es inaccesible para las plantas. En este sentido, diversas bacterias del suelo son capaces de secretar quelantes de hierro, llamados sideróforos, que tiene una alta afinidad por el hierro (Fig. 4). De esta manera, logran captar el hierro de los compuestos citados anteriormente para su uso. Por este motivo, si estas bacterias se inoculan en la rizosfera, se logra aumentar la accesibilidad de las plantas al hierro (Rajkumar et al., 2010; Sayyed et al., 2013). Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* ha demostrado su habilidad para producir sideróforos (Manwar et al., 2004).

3.2. Desarrollo y estabilidad de biofertilizantes

Los microorganismos beneficiosos para la agricultura son utilizados para el desarrollo de biofertilizantes. Como se ha descrito anteriormente, los biofertilizantes, además de por microorganismos, están compuestos por otras sustancias portadoras. La función de los portadores es estabilizar los microorganismos, ayudar a la liberación de estos una vez aplicados en el suelo y/o proteger los microorganismos y aumentar su funcionalidad en las plantas (Shaikh et al., 2015; Sahu & Brahma Prakash, 2016). Existen una gran variedad de sustancias que pueden ser utilizadas para el desarrollo de estos productos, aunque existen ciertas características que deben poseer estos portadores. El portador ideal debe extender la viabilidad de los microorganismos y ser resistente a condiciones ambientales, sobretodo temperatura y humedad. De manera que los microorganismos sean estables en el formulado y facilite su supervivencia en el suelo una vez aplicados. Para ello es necesario que las sustancias utilizadas tengan una buena capacidad tamponadora de pH e idealmente sean materiales estériles o que al esterilizarlos no pierdan sus propiedades. Utilizar materiales estériles aporta la certeza de que únicamente se está inoculando el microorganismo deseado y un mayor control sobre la concentración de este. Además, es esencial que se trate de una sustancia biodegradable y que no genere toxicidad al medio ambiente o la planta. Por otro lado, a nivel comercial, los materiales portadores deben ser económicos y fácilmente disponibles (Bashan et al., 2013; Sahu & Brahma Prakash, 2016). Los materiales y formulaciones para el desarrollo de biofertilizantes se pueden dividir en diversos grupos (Bashan, 1998; Malusá et al. 2012).

1. Suelos, como son la turba, carbón, arcilla o suelo inorgánico.
2. Materiales vegetales de desecho, como el compost, estiércol o residuos agrícolas.
3. Materiales inertes, como vermiculita o perlita.
4. Cultivos microbianos liofilizados o secados, que pueden usarse directamente o incorporarse a un portador sólido.
5. Formulaciones líquidas, basadas en agua o aceite, donde se agregan aditivos para mejorar la estabilidad de los microorganismos.

De esta manera, el tipo de materiales portadores a utilizar está definido por la forma física final del biofertilizante a desarrollar, así debemos separar el desarrollo de la formulación de biofertilizantes sólidos, de aquellos líquidos. En el caso de los sólidos, la tecnología más usada es la liofilización de los microorganismos. La liofilización se basa en el secado de los cultivos de microorganismos hasta conseguir un producto sin humedad. Esta técnica es muy útil con microorganismos capaces de formar esporas o formas de resistencia, ya que al reducir la humedad se activan estas formas de resistencia y el microorganismo entra en un estado de latencia. El estado de latencia implica que el microorganismo cese la actividad metabólica o de reproducción, hasta que las condiciones sean más favorables para su supervivencia (Sadoff, 1975; Nicholson et al., 2000). Por tanto, esta técnica es muy escogida si se formula un biofertilizante con microorganismos formadores de esporas y se desea obtener un producto sólido. Además, este producto sólido puede comercializarse solo o en conjunto con otras sustancias que potencien la efectividad de este microorganismo en la planta. Estos materiales son usados porque previenen la desecación y ayudan al crecimiento rápido de los microorganismos después de la liberación, ya que les aporta sustancias necesarias para la activación de los microorganismos y la reproducción (Morgan et al., 2006; Prakash et al., 2013).

Por otro lado, la estabilización de los microorganismos en medios líquidos para la formulación de biofertilizantes líquidos implica un reto mayor. Estas formulaciones suelen estar basadas en medios acuosos o basados en aceites. Además de utilizar portadores adecuados, es útil utilizar aditivos como protectores celulares. Existen diversos protectores celulares, como son la glucosa, sacarosa, maltosa, trehalosa, y glicerol (Stamenković et al., 2018). En cualquier caso, al tratarse de organismos vivos, la estabilidad de estos productos durante el almacenaje y su correcta liberación y eficacia una vez aplicados al suelo sigue siendo un reto y está en constante investigación.

Actualmente se estudia el uso de polímeros, que encapsulan e inmovilizan los microorganismos y los liberan gradualmente al suelo (He et al., 2015; Vassilev et al., 2020).

4. Interés ambiental de los biofertilizantes

La población mundial ha estado en constante crecimiento desde 1950, sin embargo, a partir de 1970 se observó un crecimiento exponencial muy pronunciado (United Nations, 2019). Esto fue debido en parte a la mejora en la agricultura. En el siglo XX se produjo una revolución agrícola debido a la expansión de los fertilizantes y las nuevas tecnologías agrícolas. El hito más importante que marcó esta revolución fue el descubrimiento del proceso Haber-Bosch. El proceso Haber-Bosch consiste en la síntesis de amoníaco a partir de nitrógeno e hidrógeno. Este descubrimiento en 1909 y posterior escalada a nivel industrial en 1913, implicó un aumento de la producción agrícola. Hoy en día se calcula que gracias al uso de fertilizantes derivados del proceso Haber-Bosch se alimenta al 50% de la población (Galloway et al., 2013). De esta manera, el aumento de la producción agrícola, juntamente con las mejoras en salud y calidad de vida, han implicado un aumento muy marcado de la población mundial en las últimas décadas. Este aumento exponencial de la población, junto con la limitada disponibilidad de tierras cultivables, entre otros factores, ha causado un creciente interés por el estudio y la mejora de la agricultura. Actualmente, debido al cambio climático que experimentamos, la tierra cultivable a nivel mundial ha disminuido. De esta manera, hoy en día, la biocapacidad media a nivel mundial es de 1,6 hectáreas cultivables por persona. Sin embargo, se ha estimado que son necesarias 2,77 hectáreas cultivables por persona para abastecer a la población según las demandas actuales, este cálculo se conoce como huella ecológica (Global Footprint Network, 2019; United Nations, 2019). Debido a esta situación, es fundamental aumentar la productividad agrícola, manteniendo la salud de los cultivos y la calidad de los frutos, para satisfacer la creciente demanda de alimentos de la población. En este sentido, los nutrientes son esenciales para el correcto desarrollo de los cultivos, y es necesario proporcionarlos en la cantidad correcta para cada cultivo y en la forma asimilable para la planta. Por este motivo, generalmente, los nutrientes son proporcionados a los cultivos a través de fertilizantes químicos en exceso, para garantizar la productividad

de estos. Sin embargo, esta práctica puede conllevar un uso excesivo de los recursos nutricionales limitados del planeta y una contaminación ambiental derivada de la lixiviación del exceso de nutrientes (Ju et al., 2007; Savci, 2012). Debido a estos motivos, en las últimas décadas se ha observado un cambio de paradigma en la agricultura, que se centra en una agricultura de precisión y una demanda de alternativas respetuosas con el medio ambiente. En este sentido, el uso de microorganismos en agricultura, a través de biofertilizantes, ha surgido como una alternativa al uso excesivo de fertilizantes químicos. El uso de microorganismos beneficiosos en agricultura permite un uso más eficiente de los nutrientes del suelo, de manera que se reduce la necesidad de aporte de nutrientes. Por otro lado, mejorando la disponibilidad de nutrientes para el uso de estos por los cultivos, disminuye la contaminación derivada de los nutrientes residuales en suelo, que generalmente provocan una eutrofización y forman lixiviados, contaminando aguas subterráneas. Por último, los biofertilizantes mejoran la biodiversidad y fertilidad del suelo, consiguiendo frenar la pérdida de tierras cultivables en el planeta (Timmusk et al., 2017; Bargaz et al., 2018).

Debido a la problemática expuesta, las Naciones Unidas incluye los objetivos mencionados entre los 17 objetivos de desarrollo sostenible, diseñados para mejorar la sostenibilidad ambiental, económica y social para el 2030 (United Nations General Assembly, 2015). En este sentido, el segundo objetivo expuesto se basa en: “Poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y la mejora de la nutrición y promover la agricultura sostenible”. En este objetivo se proponen varias metas para el 2030, entre ellas duplicar la productividad agrícola por tal de asegurar el acceso a los alimentos de toda la población. Además, se propone conseguir este objetivo al mismo tiempo que se asegura la sostenibilidad de los sistemas de producción de alimentos. Esto debe llevarse a cabo a través de prácticas agrícolas que aumenten la productividad a la vez que favorezcan el mantenimiento de los ecosistemas y mejoren la calidad de los suelos. De esta manera, el desarrollo y uso de biofertilizantes en agricultura puede permitir lograr estos objetivos (Robertson & Swinton, 2005; United Nations General Assembly, 2015).

5. Interés comercial de los biofertilizantes

En los últimos años, la demanda de biofertilizantes ha aumentado en todo el mundo. El mercado mundial de biofertilizantes se valoró en 1000 millones de dólares en 2019, y la previsión de crecimiento de estos productos en el mercado, para el periodo de 2020 a 2027, es del 12,8% anual (TechSci, 2020). Esta expansión de los fertilizantes microbianos es debida a un creciente grado de conciencia ambiental, motivo por el cual el número de leyes que protegen el medio ambiente está en aumento en todo el mundo y la demanda de productos ecológicos es cada vez mayor (Malusá et al., 2012; Itelima et al., 2018). Según el tipo de biofertilizantes, los biofertilizantes basados en microorganismos fijadores de nitrógeno son comercialmente los más comunes, representando un 71,2% del mercado de biofertilizantes en 2019. Esto es debido, por un lado, a que los microorganismos diazotróficos han sido más estudiados en las últimas décadas. Además, por otro lado, el nitrógeno es uno de los principales macronutrientes esenciales y limitantes para el crecimiento vegetal, motivo por el cual los fertilizantes que proporcionan nitrógeno suelen tener gran demanda comercial. Seguidamente, los biofertilizantes solubilizadores de fósforo son el segundo tipo más comúnmente utilizado, ya que este nutriente también forma parte de los macronutrientes esenciales para el crecimiento vegetal. Por último, también encontramos una presencia más reducida de biofertilizantes movilizadores de potasio, microorganismos solubilizantes de zinc y productos líquidos con consorcios de microorganismos (TechSci, 2020).

6. El cultivo de plantas de tomate y maíz como modelos de estudio

Tanto la planta de tomate, como el maíz, son dos cultivos utilizados como plantas modelo en diversos estudios. En el caso de la planta de tomate (*Solanum lycopersicum*), es un modelo que engloba las hortícolas. La horticultura es un sector económico importante relacionado con la producción y provisión de una amplia gama de cultivos para las industrias de alimentos, piensos y ornamentales y representa una fracción muy importante de la agricultura en todo el mundo. En este sector, el tomate

es uno de los cultivos más producidos y consumidos en el mundo. Además, es un cultivo de ciclo corto, motivo por el cual es útil para estudios agronómicos en los cuales se estudia el fruto en estadio de cosecha. Por estos motivos la planta de tomate es un cultivo altamente estudiado y con gran interés científico y comercial (Kimura & Sinha, 2008; De Pablo & Battistuzzi, 2012).

Por otro lado, el maíz (*Zea mays*) es un cultivo modelo que engloba los cereales. Los cereales son un sector primordial en agricultura, ya que son el mayor aporte de alimento de la humanidad y casi la mitad del requerimiento calórico. Además, el maíz es uno de los tres cereales principales, que juntamente con el trigo y el arroz, son el 94% del consumo de cereales en el mundo. Por otro lado, el maíz es un cultivo altamente demandante de nitrógeno, y por este motivo, es útil para realizar estudios agronómicos con fertilizantes que aporten nitrógeno (Strable & Scanlon, 2009; Ranum et al., 2014).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es el desarrollo de biofertilizantes que mejoren el rendimiento y/o la calidad de los frutos de la planta de tomate y maíz. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Seleccionar los microorganismos adecuados para su uso como inóculos en biofertilizantes para plantas de tomate y maíz.
- Formular biofertilizantes sólidos que permitan la estabilidad y viabilidad de los microorganismos durante un año
- Formular biofertilizantes líquidos que permitan la estabilidad y viabilidad de los microorganismos durante un año
- Ensayar los biofertilizantes sólidos y líquidos desarrollados en planta de tomate o maíz, y analizar el rendimiento de los cultivos y la calidad de los frutos, como parámetros de interés agronómico.

CAPÍTULO 1

SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS PARA SU USO COMO BIOFERTILIZANTES

CAPÍTULO 1: SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS PARA SU USO COMO BIOFERTILIZANTES

Resumen

Debido al creciente interés ambiental y comercial de los biofertilizantes en los últimos años, ha surgido la necesidad de investigar nuevos inóculos microbianos útiles en agricultura. Por este motivo, el presente estudio tiene como objetivo ensayar tres bacterias (*Pseudomonas* [REDACTED], *Azotobacter* [REDACTED] y *Bacillus* [REDACTED]) como potenciales inóculos para biofertilizantes en plantas de tomate. En este sentido, *P.* [REDACTED] se ensayó en plantas sin deficiencia de nutrientes y demostró aumentar el rendimiento del cultivo (peso fresco, peso seco y producción). Por otro lado, *A.* [REDACTED] se ensayó en plantas de tomate con deficiencia de nitrógeno y mostró una mejora del rendimiento del cultivo y de la calidad de los frutos, según los azúcares solubles t (TSS), acidez titulable (TA) y relación entre azúcares solubles y acidez titulable (TSS/TA). Por último, *B.* [REDACTED] se ensayó en plantas sin fósforo disponible (sustituido por fósforo insoluble), y se observó una mejora del rendimiento del cultivo. En conclusión, los tres microorganismos mostraron efectos positivos en el cultivo del tomate y por tanto fueron considerados útiles para el desarrollo de biofertilizantes.

1. Introducción

En agricultura, en los últimos años ha aumentado el interés en el uso de productos eficaces y respetuosos con el medio ambiente, entre estos productos surgieron los biofertilizantes. Debido a la creciente demanda de estos fertilizantes surgió la necesidad de investigar nuevos microorganismos útiles en agricultura, para su posterior uso como inóculos en biofertilizantes. En este sentido, diversos autores han reportado el beneficio de ciertos microorganismos en la mejora de los cultivos, ya sea en el crecimiento de la planta, el rendimiento final del cultivo o la calidad de los frutos en cosecha (Orhan et al., 2006; Gravel et al., 2007; Esitken et al., 2010; Liu et al., 2018). Estos beneficios son debido al efecto de los microorganismos en la mejora de la

disponibilidad de los nutrientes y/o gracias a la producción de PGRs (Olanrewaju et al., 2017).

Los microorganismos han demostrado su eficacia en múltiples cultivos. Sin embargo, dado que la planta de tomate es un cultivo con gran importancia agronómica y generalmente utilizado como planta modelo (De Pablo & Battistuzzi, 2012), se han llevado a cabo diversos estudios con microorganismos beneficiosos en agricultura en este cultivo. De esta manera, se ha observado que ciertas bacterias poseen la capacidad de sintetizar PGRs y/o mejorar la disponibilidad de nutrientes para las plantas. Gracias a estas acciones, estas bacterias pueden mejorar el crecimiento de la planta, el rendimiento del cultivo y/o la calidad de los frutos. Las bacterias ensayadas en plantas de tomate y sus efectos están resumidos en la Tabla 1.

Por estos motivos, en el presente estudio se escogió la planta de tomate para ensayar tres microorganismos como potenciales inóculos para el desarrollo de biofertilizantes. Por un lado, se escogió *Pseudomonas* [REDACTED] como bacteria productora de PGRs. La mayoría de las cepas de *P.* [REDACTED] estudiadas son productoras de ACC-deaminasa e IAA (Suzuki et al., 2003; Saravanakumar & Samiyappan, 2007; Kochar et al., 2011). Además, varias cepas también han demostrado su capacidad de producir sideróforos y se ha observado su implicación en la solubilización del fósforo (Park et al., 2009; Trapet et al., 2016).

Por otro lado, se ensayó *Azotobacter* [REDACTED] como bacteria fijadora de nitrógeno. *A.* [REDACTED] contrariamente a otros microorganismos diazotróficos, es capaz de fijar el nitrógeno en condiciones aeróbicas. Esta habilidad lo convierte en un microorganismo de vida libre muy útil como potencial biofertilizante (Poole & Hill, 1997; Noar et al., 2018).

Por último, *Bacillus* [REDACTED] fue escogida por su capacidad como solubilizadora de fósforo. *B.* [REDACTED] ha demostrado solubilizar fuentes de fósforo insolubles gracias a la producción de ácidos orgánicos y enzimas fosfatasa (Hu et al., 2013; Wyciszkievicz et al., 2017; Saeid et al., 2018).

De esta manera, los objetivos en el presente estudio fueron: (1) analizar el efecto de *P.* [REDACTED] en el rendimiento del cultivo del tomate y en la calidad de los frutos en cosecha; (2) analizar el efecto de *A.* [REDACTED] en el cultivo del tomate en

Microorganismo	Interacción microorganismo - planta	Mecanismo de acción		Efecto en plantas de tomate	Referencias
		Producción promotores del crecimiento	Efecto sobre disponibilidad de nutrientes		
<i>Achromobacter piechaudii</i>	Rizosférico	ACC-deaminasa	-	↑ Peso fresco frutos ↑ Peso seco frutos ↑ Resistencia a sequía y salinidad	(Mayak et al., 2004a; Mayak et al., 2004b)
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Rizosférico	IAA ACC-deaminasa	Fijador N ₂ Sideróforos	↑ Resistencia a sequía y salinidad)	(Viscardi et al., 2016; Van et al., 2018)
<i>Azospirillum brasilense</i>	Endófito	-	Fijador N ₂	↑ Longitud tallo	(Botta et al., 2013)
<i>Azospirillum lipoferum</i>	Rizosférico/ Endófito	ACC-deaminasa CKs	Fijador N ₂	↑ Longitud raíces	(Esquivel-Cote et al., 2010)
<i>Bacillus circulans</i>	Rizosférico	ACC-deaminasa Auxinas	Fijador N ₂ Solubilizador P Sideróforos	↑ Longitud raíces ↑ Longitud tallo	(Mehta et al., 2014)
<i>Bacillus megaterium</i>	Rizosférico	ACC-deaminasa	Solubilizador P	↑ Producción	(El-Yazeid&Abou-Aly, 2011; Dudás et al., 2017)
<i>Bacillus subtilis</i>	Rizosférico/ Endófito	IAA ACC-deaminasa	Fijador N ₂ Solubilizador P Sideróforos	↑ Producción ↑ Peso fresco frutos ↑ Longitud raíces ↑ Longitud tallo	(Mena-Violante & Olalde-Portugal, 2007; Xu et al., 2013; Walia et al., 2013; Chauhan et al., 2014)
<i>Burkholderia unamae</i>	Rizosférico/ Endófito	ACC-deaminasa	Fijador N ₂ Sideróforos	*Ensayos en laboratorio	(Caballero-Mellado, 2004; Caballero-Mellado et al, 2007; Onofre-Lemus et al., 2009)
<i>Burkholderia sp.</i>	Rizosférico/ Endófito	IAA ACC-deaminasa	Fijador N ₂ Solubilizador P	↑ Producción ↑ Longitud raíces ↑ Longitud tallo	(Gao et al., 2015)
<i>Chryseobacterium sp.</i>	Rizosférico	IAA	Sideróforos	↑ Peso seco tallo ↑ Diámetro tallo	(Radzki et al., 2013; Abbamondi et al., 2016)
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Endófito	IAA	Fijador N ₂ Solubilizador P	↑ Producción ↑ Peso seco tallo	(El-Yazeid&Abou-Aly, 2011; Weselowski et al., 2016)
<i>Pseudomonas putida</i>	Rizosférico/ Endófito	IAA ACC-deaminasa	Solubilizador P	↑ Producción ↑ Peso fresco tallo ↑ Peso fresco raíces	(Gravel et al., 2007; Kumar et al., 2015; Pastor et al., 2016)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Rizosférico/ Endófito/ Endosimbionte	IAA ACC-deaminasa	Sideróforos Solubilizador P	↑ Peso fresco frutos ↑ Peso seco tallo ↑ Peso seco raíces	(García-Fraile et al., 2012; Abbamondi et al., 2016)
<i>Sphingomonas sp.</i>	Endófito	IAA GAs	-	↑ Peso seco tallo ↑ Peso seco raíces ↑ Longitud tallo	(Khan et al., 2014)

Tabla 1. Microorganismos ensayados en planta de tomate y sus efectos en la planta y frutos. ACC: 1-aminociclopropano-1-carboxílico; IAA: Ácido indol-3-acético; CK: Citoquinina; GA: Giberelina; N: Nitrógeno; P: Fósforo.

condición de baja disponibilidad de nitrógeno y (3) analizar *B.* [REDACTED] en el cultivo del tomate en condiciones de baja disponibilidad de fósforo.

2. Métodos

Microorganismos

Los tres microorganismos utilizados en este ensayo provienen de dos compañías. *P.* [REDACTED] provienen de [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] (Valencia, España), mientras que *A.* [REDACTED] y *B.* [REDACTED] provienen de la empresa [REDACTED] (Madrid, España).

Diseño experimental y muestreo

El ensayo se realizó en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. *Meyity*), variedad de tomate pera, elegida para el estudio por su interés comercial y económico. Las semillas se compraron en la Cooperativa Agrícola del Vallés (Llerona, NE España). Las semillas se sembraron en sustrato de perlita, vermiculita y turba el 5 de febrero de 2018 y se cultivaron bajo un fotoperiodo largo (régimen de 16 h de luz / 8 h de oscuridad) en una cámara de ambiente constante (temperatura del aire entre 21 y 23°C y humedad relativa en torno al 65%). Tres semanas después, las plantas se transfirieron a multipots con el mismo sustrato y se mantuvieron en las mismas condiciones en la cámara de crecimiento hasta el 12 de marzo de 2018. Seguidamente, las plantas se transfirieron a macetas de 4L (una planta por maceta) con el mismo sustrato y se cultivaron en invernadero en la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona (Barcelona, NE España) hasta el final del período de estudio el 21 de junio de 2018. Después del trasplante, todas las plantas se regaron tres veces por semana con solución Hoagland. Catorce días después, el 26 de marzo de 2018, las plantas se dividieron en seis grupos de 6 plantas cada uno: (1) grupo control, regado con solución Hoagland al 50% (Hoagland & Arnon, 1938); (2) grupo regado con solución Hoagland e inoculación de *Pseudomonas* [REDACTED] (3) grupo deficiente en nitrógeno, regado con solución Hoagland modificada con una reducción del 20% de nitrógeno; y (4) grupo regado con solución Hoagland deficiente en nitrógeno e inoculación de *Azotobacter* [REDACTED] (5) grupo deficiente en fósforo, regado con solución de Hoagland modificada, en la que el fósforo soluble ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ a 115,08 g / L) se reemplazó por

fósforo insoluble (fosfato de roca blando) y (6) grupo regado con solución de Hoagland con fósforo insoluble e inoculación de *Bacillus* [REDACTED]

En el momento de inicio de los tratamientos se llevó a cabo la primera inoculación de microorganismos, inoculando el microorganismo pertinente en una concentración final de 10^6 ufc/g a aquellos tratamientos que corresponda y seguidamente la solución nutricional. Se realiza una segunda inoculación 14 días después de la primera.

Para todos los tratamientos, se cosecharon todos los frutos los días 20 y 21 de junio de 2018 y se calculó la producción por planta (kg de tomate/planta) y el peso fresco y seco por tomate. Además, 6 tomates de cada planta fueron utilizados para analizar los TSS, TA y TSS/TA.

Parámetros de rendimiento y calidad de la fruta

La producción total de frutos por planta se midió en la primera cosecha (entre el 20 y el 21 de junio de 2018). Además, se midieron el peso fresco y el peso seco de los tomates pesando los frutos recién cosechados. Por otro lado, la calidad del tomate se determinó midiendo los TSS, TA y la relación TSS / TA. Para el análisis de la calidad de la fruta se extrajo jugo de tomate. Se utilizó un ml de jugo para determinar los TSS utilizando un refractómetro digital HI 96,801 (HANNA instruments, Woonsocket, EE.UU.). Además, se diluyeron 10 mL de jugo con 100 mL de agua destilada y esta solución se utilizó para la determinación de TA con NaOH 0.1 N, utilizando como indicador fenolftaleína (1%) (Latimer, 2016).

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza factorial de una vía (ANOVA), seguido de pruebas post hoc de Tukey HSD, utilizando IBM® SPSS® Statistics 19 (Armonk, NY). Las diferencias se consideraron significativas a un nivel de probabilidad de $p < 0,05$.

3. Resultados

Pseudomonas ██████████

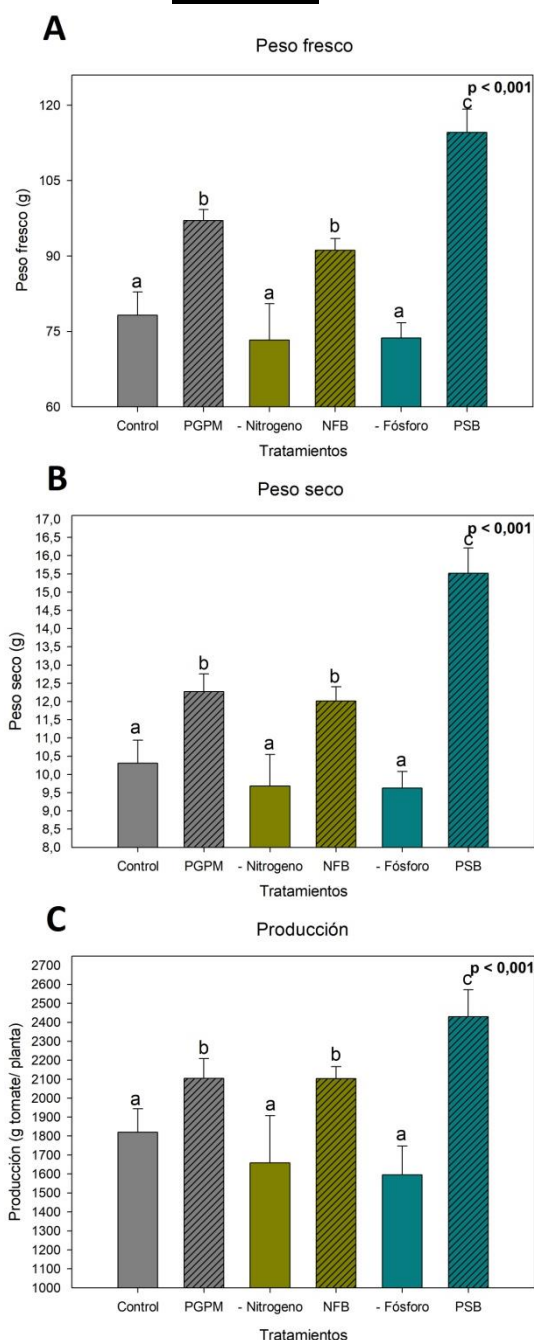


Figura 5. Rendimiento del cultivo del tomate según el tratamiento. A) Peso fresco, B) Peso seco, C) Producción.

PGPM: *P. ██████████* -Nitrógeno: Tratamiento con deficiencia de nitrógeno. NFB: Plantas con deficiencia de nitrógeno y A. ██████████ - Fósforo: Plantas sin fósforo soluble; PSB: Plantas sin fósforo soluble y B. ██████████

Los resultados muestran que el peso fresco y peso seco de los tomates varía significativamente en el grupo inoculado con *P. ██████████* en comparación con el grupo control. En las plantas tratadas con *P. ██████████* se observa un aumento del peso fresco de los tomates de un 24% (Fig. 5A), mientras que el peso seco aumenta un 19% (Fig. 5B). Esta variación en el peso de los tomates se traduce en un aumento de la producción total del cultivo (kg tomate/planta), que muestra un incremento del 15% (Fig. 5C).

Por otro lado, los parámetros de calidad del tomate no se ven afectados por la inoculación de esta bacteria. De esta manera, tanto los TSS (Fig. 5D), TA (Fig. 5E), como la relación TSS/TA (Fig. 5F) se mantienen con valores similares en las plantas control y las plantas tratadas con *P. ██████████*

Azotobacter [REDACTED]

En el caso de las plantas deficientes en nitrógeno, se observan diferencias entre aquellas que se trataron con *A. [REDACTED]* en comparación con aquellas que únicamente obtuvieron la solución deficiente en nitrógeno. En cuanto al peso fresco de los frutos, el grupo tratado con *A. [REDACTED]* mostró un aumento del 24% en comparación con el grupo no tratado (Fig. 5A). De la misma manera, el incremento en el peso seco fue del 24% (Fig. 5B). Como consecuencia, la producción total se vio incrementada en un 27% (Fig. 5C).

Además, la calidad del tomate mejoró. Los TSS se incrementaron un 7% (Fig. 6A), mientras que TA se redujo en un 7% (Fig. 6B). La variación en estos dos parámetros implicó un aumento de la relación del TSS/TA del 15% (Fig. 6C). Por otro lado, se observa que los parámetros de calidad de los tomates tratados con *A. [REDACTED]* son similares a los obtenidos en el grupo control, tratado con una solución nutricional sin deficiencia de nutrientes.

Bacillus [REDACTED]

Entre las plantas tratadas con una solución deficiente en fósforo disponible, aquellas en las que se incorporó *B. [REDACTED]* mejoraron el rendimiento del cultivo. En este sentido, el peso fresco aumentó en un 55% (Fig. 5A), mientras que el peso seco lo hizo un 60% (Fig. 5B). De manera similar, la producción total del cultivo se incrementó en un 52% (Fig. 5C).

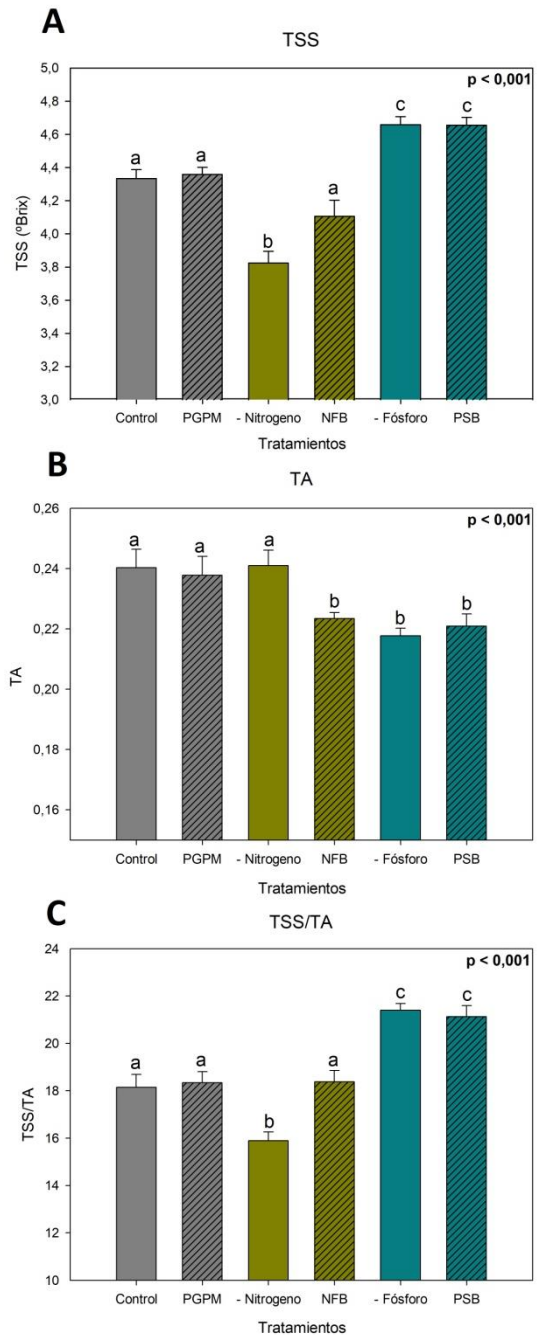


Figura 6. Calidad del fruto en el cultivo del tomate según el tratamiento. A) TSS, B) TA y C) TSS/TA. PGPM: *P. [REDACTED]* -Nitrógeno: Tratamiento con deficiencia de nitrógeno. NFB: Plantas con deficiencia de nitrógeno y *A. [REDACTED]* - Fósforo: Plantas sin fósforo soluble; PSB: Plantas sin fósforo soluble y *B. [REDACTED]*

Sin embargo, la calidad de los tomates permaneció similar en ambos grupos, es decir, los parámetros TSS (Fig. 6A), TA (Fig. 6B) y TSS/TA (Fig. 6C) no sufrieron variaciones debido al tratamiento con *B. [REDACTED]*. Sin embargo, en todas las plantas con reducción de fósforo disponible, independientemente del uso o no de microorganismos, se incrementó la calidad final del fruto (Anexo 2).

4. Discusión

Pseudomonas [REDACTED]

Las PGRs son utilizadas por su mejora en el crecimiento de las plantas y en el rendimiento de los cultivos (Tabla 1). En este sentido, *P. [REDACTED]* es capaz de sintetizar IAA y ACC-deaminasa (Suzuki et al., 2003; Saravanakumar & Samiyappan, 2007; Kochar et al., 2011). Por un lado, IAA está implicada en la división, elongación y diferenciación celular (Teale et al., 2006). Mientras que ACC-deaminasa es capaz de disminuir la producción de etileno a través de la degradación de ACC, sustancia precursora del etileno (Glick, 2014). El etileno es una fitohormona implicada en el crecimiento vegetal, desarrollo y maduración de los frutos y senescencia (Bleecker & Kende, 2000). La producción de la enzima ACC-deaminasa por bacterias que se encuentran en la raíz de la planta resulta en una reducción del ACC y por tanto en una disminución del nivel de etileno en la planta. Las consecuencias derivadas de esta interacción son un aumento significativo de la longitud de las raíces y los brotes de las plantas y un aumento de la biomasa (Glick et al., 1998; Glick et al., 2007). Además, *P. [REDACTED]* es una bacteria productora de sideróforos, de manera que cuando esta bacteria se encuentra en la rizosfera de una planta mejora la disponibilidad de hierro para esta (Trapet et al., 2016). La baja disponibilidad de hierro en la planta de tomate ha demostrado provocar la reducción del crecimiento de los frutos y del rendimiento de cultivo (Jiménez et al., 2019). Por ello, el aumento de la disponibilidad de este nutriente a través de los sideróforos mejora la producción del cultivo del tomate. Este efecto fue reportado en un estudio con plantas de tomate, al observar un incremento en el contenido de hierro en la planta gracias a los sideróforos. Este aumento en el contenido de hierro se tradujo en una mejora en la raíz y el tallo (Radzki et al., 2013)

En resumen, en este estudio *P. [REDACTED]* muestra un efecto positivo en el peso fresco y peso seco del tomate y en la producción total por plantas. Este efecto ha sido observado en otros cultivos, por ejemplo, se observó un aumento de la producción del arroz gracias a la inoculación de *P. [REDACTED]* (Hasani & Aminpanah, 2015). El mismo efecto fue observado en el cultivo de moras (García-Seco et al., 2012). Por otro lado, en el cultivo del pepino, la inoculación de esta bacteria también resultó en un incremento de la producción, además de un aumento del peso fresco de las raíces (Ahamd et al., 2015).

Azotobacter [REDACTED]

El nitrógeno es un elemento esencial en el crecimiento de las plantas, y la deficiencia de este nutriente puede provocar una reducción de la calidad de los frutos en los cultivos. En el presente estudio, una reducción del 20% del nitrógeno provocó una reducción del TSS, que se tradujo en una reducción de la relación TSS/TA, y por tanto una disminución de la calidad del fruto. Este efecto también ha sido observado en otros ensayos. Wei et al., (2018) demostraron que en plantas de tomate con una dosis baja de nitrógeno se reducía el número de frutos y la producción. Además, Hernández et al., (2020) observaron que al reducir la aplicación de nitrógeno en plantas de tomate resultaba en una disminución de producción y azúcares. En este sentido, es importante asegurar una disponibilidad suficiente de nitrógeno a lo largo del ciclo del cultivo. Por este motivo, generalmente se lleva a cabo una aplicación excesiva de nitrógeno a través de fertilizantes químicos. Sin embargo, un exceso de este nutriente en formas no asimilables para las plantas puede sufrir un proceso de lixiviación y provoca una eutrofización del ambiente, contaminando aguas subterráneas y reduciendo la fertilidad del suelo (Savci, 2012; Cameron et al., 2013). Por ello, el uso de los microorganismos diazotróficos se convierte en una alternativa eficaz para mejorar la disponibilidad de nitrógeno para los cultivos y reducir la contaminación. En este sentido, el uso de *A. [REDACTED]* en plantas de tomate con deficiencia de nitrógeno demuestra su efecto positivo. Por un lado, se observa que las plantas tratadas con *A. [REDACTED]* aumentan los azúcares solubles y reducen la acidez titulable, de manera que la relación TSS/TA aumenta. De esta manera, la calidad del tomate (según la relación TSS/TA) de las plantas deficientes en nitrógeno con incorporación de *A. [REDACTED]* se iguala a aquellas plantas sin deficiencias de nutrientes. Esto implica que la fijación de nitrógeno llevada a cabo por esta bacteria es

capaz de substituir el 20% de la fertilización nitrogenada. Además, las plantas tratadas con *A. [REDACTED]* muestran un aumento en el peso fresco y peso seco de los tomates y la producción del cultivo, en comparación con las plantas con deficiencias de nitrógeno y de aquellas sin ninguna deficiencia. Por este motivo, los resultados parecen indicar que la capacidad de fijación de nitrógeno de *A. [REDACTED]* en plantas de tomate en invernadero es mayor a la deficiencia provocada. Estos resultados coinciden con los reportados en cártamo, planta en la cual se observó que la aplicación de *A. [REDACTED]* era capaz de substituir un 50% de la fertilización nitrogenada (Nosheen & Bano, 2014). Por estos motivos el uso de *A. [REDACTED]* sería de gran utilidad en el cultivo del tomate, ya que su uso permitirá la reducción del 20% del nitrógeno aplicado a través de fertilizantes, manteniendo la calidad del tomate y aumentando el rendimiento del cultivo.

Bacillus [REDACTED]

El fósforo, otro nutriente fundamental en el desarrollo de las plantas, es un nutriente que se encuentra generalmente en formas insolubles en el suelo, de manera que solo un 1% de este está disponible para las plantas (Bünemann, 2015). El fósforo generalmente está fijado en el suelo, y es necesario el efecto de los microorganismos solubilizadores de fósforo para transformar este nutriente en formas asimilable por las plantas (H_2PO_4^- y HPO_4^{2-}) (Sharma et al., 2013).

En este estudio, las plantas con baja disponibilidad de fósforo soluble no mostraron un efecto negativo en el rendimiento o la calidad de los frutos. Además, el TSS y la relación TSS/TA aumentaron en los grupos con reducción de fósforo disponible, independientemente del uso de *B. [REDACTED]*. El estudio del efecto de la baja disponibilidad de fósforo y los posibles mecanismos implicados están descrito en el Anexo 2.

Sin embargo, la aplicación de *B. [REDACTED]* resultó en un incremento del peso fresco y peso seco del tomate y un aumento significativo de la producción final del cultivo. Esta mejora en el rendimiento del cultivo se obtiene gracias a la capacidad de solubilizar el fósforo de *B. [REDACTED]*. En este ensayo se utilizó fosfato de roca para substituir el fósforo soluble de la solución nutricional. El fosfato de roca es un fosfato inorgánico insoluble, que generalmente se solubiliza en el suelo lentamente. El uso de

B. [REDACTED] potencia la solubilización de este fósforo gracias a la síntesis de ácidos orgánicos de esta bacteria, ya que *B.* [REDACTED] es capaz de sintetizar ácidos orgánicos que excreta al medio. Estos ácidos provocan una disminución del pH y una degradación de los fosfatos insolubles, liberando el fósforo en forma disponible para las plantas (Yu et al., 2012; Saeid et al., 2018). Por este motivo, aumenta la disponibilidad de fósforo en las plantas de tomate, que implica una mejora en el rendimiento final del cultivo. Los resultados positivos de la aplicación de *B.* [REDACTED] coinciden con los observados por Dursun et al., (2010), que reportaron un aumento del peso fresco del tomate y de la producción por planta tanto en plantas de tomate como en pepino.

5. Conclusión

La aplicación de las bacterias *P.* [REDACTED] *A.* [REDACTED] y *B.* [REDACTED] por separado, mejoran el cultivo del tomate. *P.* [REDACTED] es capaz de mejorar el rendimiento del cultivo del tomate gracias a sus diversas capacidades beneficiosas para los cultivos. Por otro lado, la aplicación de *A.* [REDACTED] permite reducir la aplicación de fertilizantes nitrogenados en al menos un 20%, manteniendo la calidad del fruto e incluso aumentando el rendimiento final del cultivo. Por último, el uso de *B.* [REDACTED] en plantas de tomate en condiciones de baja disponibilidad de fósforo mejora el rendimiento y mantiene la calidad del fruto. Por estos motivos, las tres especies bacterianas ensayadas muestran efectos útiles para su uso como inóculos en biofertilizantes.

CAPÍTULO 2

FORMULADO DE BIOFERILIZANTES Y ESTABILIDAD DE MICROORGANISMOS

CAPÍTULO 2: FORMULADO DE BIOFERTILIZANTES Y ESTABILIDAD DE MICROORGANISMOS

Resumen

Los biofertilizantes son productos compuestos por inóculos microbianos y sustancias portadoras. En el desarrollo de biofertilizantes es esencial la selección de materiales portadores y/o aditivos que ayuden a mantener la viabilidad de los microorganismos. Por este motivo, los objetivos del presente estudio fueron formular tres biofertilizantes sólidos y tres biofertilizantes líquidos que mantengan una población microbiana estable durante un año. En este sentido, los tres biofertilizantes sólidos demostraron tener una concentración microbiana estable debido a la reducción de la humedad. Por otro lado, los inóculos microbianos en los biofertilizantes líquidos fueron estables cuando se les agregó [REDACTED] como protector celular. En conclusión, los microorganismos fueron estables durante un año en condiciones de baja humedad, en el caso de los biofertilizantes sólidos, o gracias al aditivo [REDACTED] en el caso de los biofertilizantes líquidos.

1. Introducción

Los biofertilizantes están compuestos esencialmente de un inóculo microbiano y sustancias portadoras. En este sentido, en el desarrollo de biofertilizantes, primeramente, es esencial la selección del inóculo, es decir, la selección de una o varias especies de microorganismos con características útiles para la mejora del desarrollo de los cultivos (Capítulo 1). Seguidamente, es importante la selección de las sustancias portadoras. Las sustancias portadoras deben asegurar que los microorganismos sean viables y estables en el producto final, es decir, mantener la concentración de microorganismos durante el almacenamiento y transporte, y ayudar a la activación y funcionalidad de estos una vez aplicados al suelo (Malusá et al. 2012; Shaikh et al., 2015). En este sentido, los microorganismos pueden comercializarse únicamente con las sustancias portadoras necesarias para estos propósitos. Sin embargo, los inóculos microbianos han demostrado ser capaces de reducir la

necesidad de fertilizantes químicos, pero no de substituirlos completamente (Adesemoye et al., 2009; Dasgan et al., 2012). Por este motivo, una alternativa interesante es el desarrollo de productos que combinen el aporte de nutrientes y de microorganismos. El uso de formulados que contengan nutrientes como material portador para microorganismos posee varias ventajas. Por un lado, se aporta en un solo producto los nutrientes y los microorganismos necesarios. A la misma vez, se aumenta la eficiencia de los nutrientes aportados gracias a la acción de los microorganismos (Adesemoye & Kloepper, 2009; Meena et al., 2017). Además, el uso de microorganismos puede ser de gran utilidad en agricultura ecológica. Por este motivo, en el desarrollo de biofertilizantes que combinen microorganismos y nutrientes debe considerarse el uso exclusivo de sustancias portadoras que estén permitidas en agricultura ecológica. Se consideran sustancias permitidas en agricultura ecológica las incluidas en el Reglamento de Agricultura Ecológica, que en Europa se basa en el Reglamento (CE) 834/2007, o bien aquellas certificadas por un organismo de certificación oficial. De esta manera, el biofertilizante desarrollado, además de las ventajas mencionadas, poseerá la ventaja de ser ecológico.

Por otro lado, la combinación de nutrientes y microorganismos presenta una limitación, ya que los abonos no son estériles y esto presenta un desafío en la estabilidad de la concentración de microorganismos en este ambiente (Bashan et al., 2013). En este sentido, debemos dividir los fertilizantes sólidos de los líquidos. En el caso de los biofertilizantes sólidos, la técnica más utilizada para la estabilización de los microorganismos a largo plazo es la liofilización (Abadias et al., 2001; Morgan et al., 2006; Stephan et al., 2016). Seguidamente, los microorganismos liofilizados pueden utilizarse directamente o agregarse a otras sustancias o formulados sólidos, como por ejemplo a fertilizantes granulados, de manera que el inóculo se adhiera al granulado (Herrmann & Lesueur, 2013). Mientras que en biofertilizantes líquidos se deben llevar a cabo otros métodos para lograr mantener la viabilidad de los microorganismos a largo plazo. Por estos motivos, generalmente se utilizan ciertos aditivos que actúan como protectores celulares. En este sentido, se ha observado el efecto positivo de ciertos aditivos como el glicerol, la glucosa, el polietilenglicol, la polivinilpirrolidona, la goma arábiga o la trehalosa, entre otros (Lee et al., 2016; Sahu & Brahma Prakash, 2016).

Debido a la importancia del formulado de los biofertilizantes, y la necesidad de obtener productos con una vida útil que permita el almacenamiento y distribución de estos, los objetivos del presente estudio fueron: (1) desarrollar y estudiar la estabilidad de tres biofertilizantes granulados con microorganismos liofilizados o en medio líquido y (2) desarrollar y estudiar la estabilidad de tres biofertilizantes líquidos y el efecto de la concentración inicial de microorganismos y del uso del [REDACTED]

2. Métodos

Inóculos, fertilizantes y formulaciones

Todas las formulaciones llevadas a cabo, tanto sólidas como líquidas, se realizaron con fertilizantes como sustancias portadoras, de manera que las sustancias portadoras no fueron estériles en ningún caso. Se formularon tres biofertilizantes granulados y tres biofertilizantes líquidos. A los productos sólidos se les añadió microorganismos en una concentración de 10^7 ufc/g y en los productos líquidos se ensayaron dos concentraciones de microorganismos, 10^7 ufc/ml y 10^9 ufc/ml. En todas las formulaciones el 100% de las sustancias utilizadas fueron sustancias permitidas en agricultura ecológica.

En cuanto a los biofertilizantes granulados, se formuló un producto basado en el fertilizante “Labinor 6-4-4”, un fertilizante NPK con 6% nitrógeno + 4% fósforo + 4% potasio (en adelante 6-4-4) con una mezcla de microorganismos líquida “[REDACTED] [REDACTED]” de la empresa [REDACTED] (Madrid, España). Esta mezcla contiene cepas de las especies *Azotobacter salinestris*, *Bacillus* [REDACTED] y *Frateuria* [REDACTED]. Por otro lado, se formuló un segundo biofertilizante basado en el fertilizante “Labinor P30”, que contiene 30% de fósforo que proviene de fosfato de roca blando (en adelante P30), con *Bacillus* [REDACTED] bacteria solubilizadora de fósforo. Esta bacteria se utilizó en forma liofilizada. Por último, se formuló un biofertilizante con el fertilizante “Labinor N-7”, que contiene un 7% de nitrógeno (en adelante N7), al que se le añadió *Azotobacter* [REDACTED] bacteria fijadora de nitrógeno. A. [REDACTED] se utilizó en forma liofilizada. Tanto la mezcla de microorganismos líquida [REDACTED] como B. [REDACTED] y A. [REDACTED] fueron pulverizados a los fertilizantes granulados durante el último paso de la fabricación de estos, durante el acondicionamiento del producto.

Por otro lado, se prepararon tres biofertilizantes líquidos. En este caso se utilizó [REDACTED] en los tres casos como aporte de microorganismos, añadiéndolo a los tres fertilizantes líquidos. Los tres fertilizantes líquidos fueron: Labinor materia orgánica, que contiene un 84% de materia orgánica (en adelante MO); Labifol Superamino, basado en aminoácidos libres (en adelante Superamino) y Labin Vegtop, basado en una mezcla de materia orgánica y aminoácidos libres (en adelante Vegtop). En cada caso se añadió la mezcla de microorganismos en dos concentraciones diferentes 10^7 ufc/ml y 10^9 ufc/ml y se ensayó el uso o no del aditivo [REDACTED]

Estado físico	Fertilizante portador	Concentración microorganismos	[REDACTED]
Líquido	MO	No	No
Líquido	Superamino	No	No
Líquido	Vegtop	No	No
Líquido	MO	10^7 ufc/ml	No
Líquido	Superamino	10^7 ufc/ml	No
Líquido	Vegtop	10^7 ufc/ml	No
Líquido	MO	10^9 ufc/ml	No
Líquido	Superamino	10^9 ufc/ml	No
Líquido	Vegtop	10^9 ufc/ml	No
Líquido	MO	10^7 ufc/ml	0,5 %
Líquido	Superamino	10^7 ufc/ml	0,5 %
Líquido	Vegtop	10^7 ufc/ml	0,5 %
Líquido	MO	10^9 ufc/ml	0,5 %
Líquido	Superamino	10^9 ufc/ml	0,5 %
Líquido	Vegtop	10^9 ufc/ml	0,5 %
Sólido	6-4-4	No	No
Sólido	P30	No	No
Sólido	N7	No	No
Sólido	6-4-4	10^8 ufc/g	No
Sólido	P30	10^8 ufc/g	No
Sólido	N7	10^8 ufc/g	No

Tabla 2. Resumen de formulados desarrollados para el estudio de viabilidad de microorganismos

Viabilidad y estabilidad de microorganismos

Inicialmente, se prepararon todos los formulados a ensayar por triplicado, según lo descrito anteriormente. Se ensayaron, por un lado, todos los fertilizantes utilizados como portadores sin añadir microorganismos, como controles. Por otro lado,

se ensayaron estos mismos fertilizantes con la adición de microorganismos a 10^7 ufc/g. Además, en los formulados líquidos se ensayó el efecto de dos factores, el aumento de la concentración inicial de microorganismos a 10^9 ufc/ml y/o la adición de [REDACTED] de origen vegetal de Oleoquímica Aritan SL (Valencia, España) en una concentración final de 0,5% (Tabla 2). Los formulados preparados se incubaron a temperatura ambiente y se analizaron los microorganismos viables el día de inicio del ensayo y cada 14 días durante un periodo de un año.

Para la realización del análisis de viables se utilizó 1 ml de los preparados líquidos y 1 g de los preparados sólidos. En el caso de sólidos se sumergieron en 1 ml de agua MiliQ estéril y se agitaron en vortex durante 1 minuto. Seguidamente, en ambos casos, se prepararon diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-9}) utilizando agua MiliQ. De cada dilución se pipeteo 10 μ l y se sembraron en agar nutritivo. Finalmente todas las placas se incubaron 48h a 28°C y posteriormente se recontaron los microorganismos viables. Todo el proceso se realizó en esterilidad y realizando tres repeticiones por cada dilución.

3. Resultados

Biofertilizantes sólidos

Los resultados muestran que el biofertilizante 6-4-4 con [REDACTED] el día 0 del ensayo ha incorporado $7,8 \times 10^8$ ufc/g de microorganismos en comparación con el producto 6-4-4 sin microorganismos añadidos. Seguidamente, se observa un pequeño aumento en la concentración de microorganismos entre la semana 2 y 4, seguido de un periodo de estabilidad en el número de microorganismos viables hasta la semana 22. Desde la semana 22 hasta el final del ensayo la población de microorganismos decrece lentamente, situándose en $7,5 \times 10^7$ ufc/g en la semana 50 (Fig. 7A).

Por otro lado, el biofertilizante P30 con *B.* [REDACTED] el día 0 del ensayo muestra una incorporación de $8,2 \times 10^8$ ufc/g microorganismos en comparación con el producto P30 sin microorganismos añadidos. Seguidamente, la población microbiana se mantiene estable hasta la semana 22 del ensayo. Finalmente entre la semana 22 y

50 se observa una disminución paulatina de la concentración de microorganismos, con un pequeño aumento la semana 38. Finalmente se establece en $9,7 \times 10^7$ ufc/g en la semana 50 (Fig. 7B).

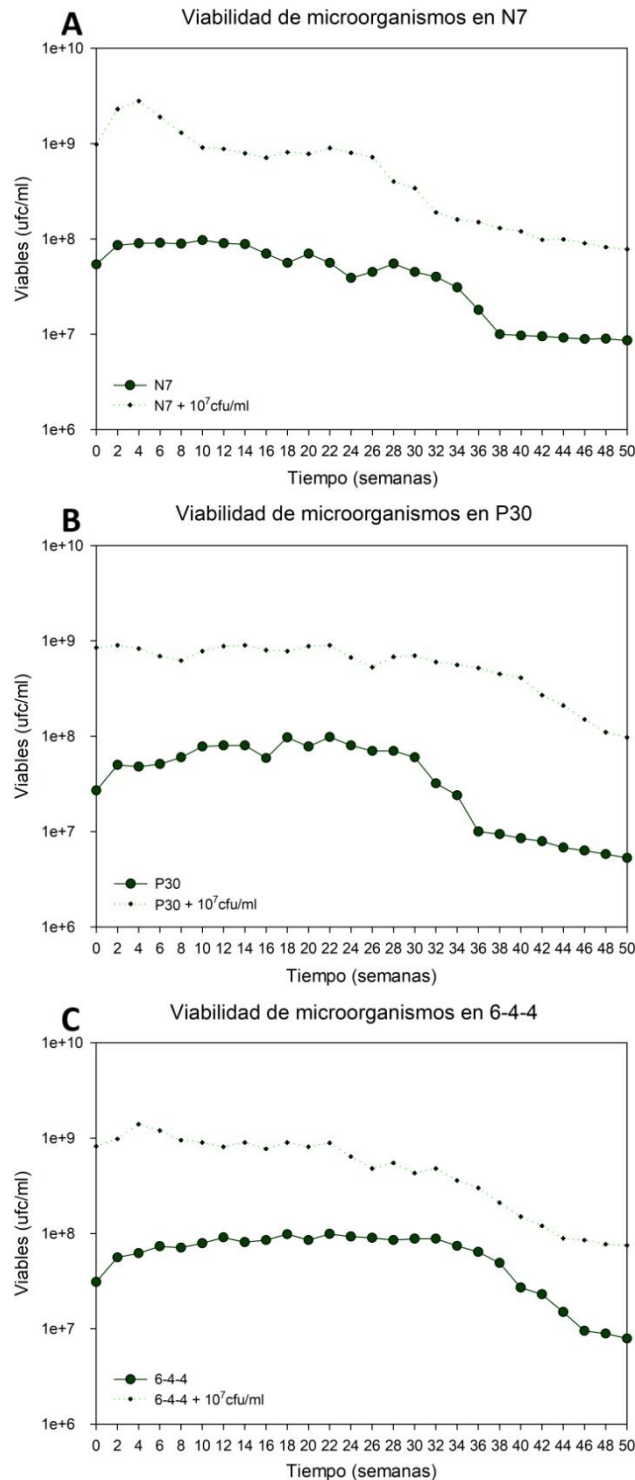


Figura 7. Viabilidad de microorganismos en fertilizantes sólidos. A) Fertilizante N7; B) Fertilizante P30 y C) Fertilizante 6-4-4

Por último, el análisis del biofertilizante N7 con A. [redacted] el día 0 del ensayo muestra que el fertilizante ha incorporado $9,2 \times 10^8$ ufc/g de microorganismos en comparación con el producto N7 sin microorganismos añadidos. Posteriormente, se observa un ligero incremento de la concentración de microorganismos entre la semana 2 y 4, seguido de una leve disminución entre la semana 6 y 10 y una estabilización entre la semana 10 y 26. Finalmente, entre la semana 26 y 50 se observa una reducción progresiva del número de viables hasta $7,8 \times 10^7$ ufc/g (Fig. 7C).

Biofertilizantes líquidos

El análisis del fertilizante MO y todas las variantes estudiadas (Fig. 8A), muestra como MO con [redacted] a 10^7 ufc/ml y MO con [redacted] a 10^9 ufc/ml mantienen una tendencia similar a lo largo de todo el ensayo. Ambos formulados aumentan la concentración de microorganismos viables durante las primeras semanas. Sin embargo, a partir de la

semana 10 cambia la tendencia y se observa una disminución progresiva del número de viables hasta el final del ensayo, momento en el que MO con [redacted] a 10^7 ufc/ml y MO con [redacted] a 10^9 ufc/ml poseen $8,9 \times 10^5$ ufc/ml y 1×10^5 ufc/ml respectivamente. De la misma manera, los dos formulados a los que se les agregó [redacted] se comportan de manera similar. La población microbiana se mantiene estable hasta la semana 28 en ambos casos. Sin embargo, MO con [redacted] a 10^7 ufc/ml y [redacted] mantiene cierta estabilidad hasta la semana 34. Seguidamente, ambos formulados muestran una leve y progresiva reducción de la concentración microbiana, situándose en $6,8 \times 10^8$ ufc/ml para el preparado MO con [redacted] a 10^7 ufc/ml y [redacted] y $1,7 \times 10^9$ ufc/ml para el preparado MO con [redacted] a 10^9 ufc/ml y [redacted]

En el caso de Superamino (Fig. 8B), los formulados con 10^7 ufc/ml y 10^9 ufc/ml muestran la misma tendencia con pequeños cambios. En el primer caso la concentración microbiana aumenta ligeramente hasta la semana 4, mientras que en el segundo producto lo hace hasta la semana 6. Seguidamente, en ambos casos, se reducen los microorganismos viables hasta la semana 50, situándose en 1×10^5 ufc/ml para el

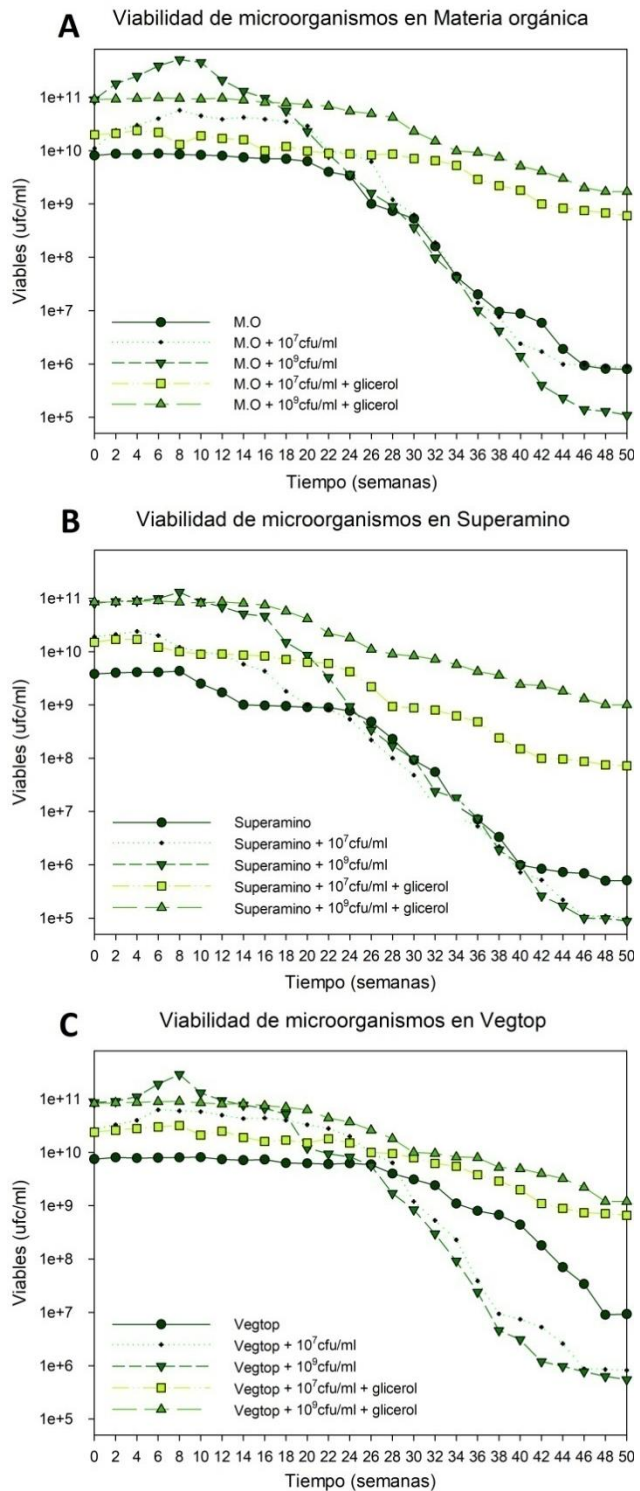


Figura 8. Viabilidad de microorganismos en fertilizantes líquidos. A) Fertilizante MO; B) Fertilizante Superamino y C) Fertilizante Vegtop

preparado con [REDACTED] a 10^7 ufc/ml y $9,8 \times 10^4$ ufc/ml para el preparado con [REDACTED] a 10^9 ufc/ml. Igualmente, los formulados que incluyen [REDACTED] muestran una tendencia similar, con algunas variaciones. Durante las primeras semanas del ensayo ambos formulados muestran una concentración microbiana estable, que se mantiene hasta la semana 22 en el caso de [REDACTED] a 10^7 ufc/ml con [REDACTED] y hasta la semana 18 en el caso de [REDACTED] a 10^9 ufc/ml con [REDACTED]. Posteriormente, se observa una reducción lenta y progresiva hasta el final del ensayo, en el que presentan $7,5 \times 10^7$ ufc/ml para el preparado con [REDACTED] a 10^7 ufc/ml y [REDACTED] y 1×10^9 ufc/ml para el preparado con [REDACTED] a 10^9 ufc/ml y [REDACTED].

Finalmente, Vegtop con [REDACTED] a 10^7 ufc/ml y 10^9 ufc/ml también muestran una tendencia semejante (Fig. 8C), aumentando ligeramente la concentración de microorganismos hasta la semana 6 y 9 respectivamente. A continuación, se observa una disminución gradual de los microorganismos viables, que finalmente se sitúa en $8,5 \times 10^5$ ufc/ml para el preparado con [REDACTED] a 10^7 ufc/ml y $6,3 \times 10^5$ ufc/ml para el preparado con [REDACTED] a 10^9 ufc/ml. Por último, los dos formulados que incluyen [REDACTED] se mantiene estables, hasta la semana 26 para el formulado con [REDACTED] a 10^7 ufc/ml y [REDACTED] y la semana 20 para el formulado con [REDACTED] a 10^9 ufc/ml y [REDACTED]. Posteriormente, ambos preparados muestran una reducción paulatina de la concentración de microorganismos hasta la semana 50, situándose en $7,1 \times 10^8$ ufc/ml y $1,2 \times 10^9$ ufc/ml para el producto con 10^7 ufc/ml y [REDACTED] y 10^9 ufc/ml y [REDACTED] respectivamente.

4. Discusión

Biofertilizantes sólidos

Los tres formulados granulares con microorganismos muestran resultados similares. La población microbiana se muestra estable hasta la semana 22-26 del ensayo, dependiendo del fertilizante portador, seguido de una disminución de esta. Finalmente, la reducción media de microorganismos durante todo el ensayo es de un orden de magnitud. Estos resultados muestran que el uso de microorganismos

lío-filizados o estabilizados en líquido, incorporados en productos sólidos granulares en las últimas etapas de la fabricación, permite una estabilidad mínima de 6 meses. Estos efectos están causados por la reducción de la humedad de estos microorganismos. En este sentido *Bacillus* [REDACTED] y *Azotobacter* [REDACTED] han demostrado ser capaces de desarrollar formas de resistencia. *B.* [REDACTED] forma esporas muy resistentes a condiciones adversas, mientras que *A.* [REDACTED] es capaz de formar quistes. Las formas de resistencia se activan en situaciones ambientales adversas. De esta manera, el microorganismo se mantiene en un estado de latencia, deteniendo su actividad metabólica y reproductiva (Sadoff, 1975; Nicholson et al., 2000). En este sentido, la reducción de la humedad consigue inducir la formación de formas de resistencia, en aquellas bacterias con esta capacidad, y mantenerlas en este estado hasta el cambio en las condiciones ambientales. Si las condiciones ambientales mejoran, estas bacterias son capaces de volver a ser funcionales (Wyss et al., 1961; Setlow & Kornberg, 1970). Los resultados de este ensayo, que muestran una estabilidad de aproximadamente 6 meses, seguida de una reducción progresiva de la concentración microbiana, podrían indicar que las formas de resistencia en este medio permiten mantener la viabilidad del microorganismo durante 6 meses. Pasado este periodo de tiempo la viabilidad disminuye paulatinamente. En este sentido, Chung et al., (2007), observaron resultados similares en *Bacillus subtilis*. En este estudio demostraron que en formulados con zeolita o minerales de arcilla, la latencia de las esporas de esta bacteria se mantenían durante 6 meses a 15-25°C. Por otro lado, Raja & Karmegam, (2010), estudiaron la viabilidad, tanto en *Azotobacter chroococcum* como en *Bacillus megaterium*, en un portador basado en vermicompost y lignita. En este estudio observaron que la viabilidad de estas bacterias dependía del ratio de vermicompost y lignita, consiguiendo mantener microorganismos viables durante 10 meses cuando se utilizaba un portador con mayor cantidad de vermicompost. De manera similar, Omer, (2010), observó, durante 6 meses, que la supervivencia de las esporas de *Bacillus* dependía del material portador utilizado. De esta manera, en el presente estudio, el uso de los fertilizantes granulares como materiales portadores permitió mantener la viabilidad de las bacterias durante 6 meses, seguida de una reducción lenta y progresiva del número de microorganismos viables.

Biofertilizantes líquidos

En el caso de los preparados líquidos con [REDACTED] se pudo observar una misma tendencia en todos los formulados que incorporaban microorganismos y no [REDACTED] independientemente de la concentración de microorganismos añadida inicialmente. En estos casos, se observó un aumento de la población en las primeras semanas del ensayo, que fue más pronunciado con los portadores MO y Vegtop, y más leve con Superamino. Este aumento de microorganismos es debido a la incorporación de estos a un medio con sustancias que son capaces de metabolizar. En el caso de MO y Vegtop, ambos productos poseen una cantidad elevada de materia orgánica. Varios estudios han demostrado el aumento de la biomasa microbiana y/o de la actividad metabólica de los microorganismos al incorporar materia orgánica al suelo (Fließbach & Mäder, 2000; Araújo et al., 2008; Araújo et al., 2009). De esta manera, las bacterias al inicio del ensayo probablemente metabolizan la materia orgánica, permitiéndoles ser activos metabólicamente y reproductivamente. Sin embargo, a partir de la semana 6 para Superamino y la semana 10 para MO, se detiene el crecimiento de las poblaciones microbianas y seguidamente la concentración de microorganismos empieza a disminuir. Este patrón de crecimiento es típico de los cultivos cerrados, es decir, cultivos en los que no se añaden nutrientes nuevos ni se eliminan los desechos. Este efecto sucede principalmente por dos factores. Primeramente, los nutrientes del cultivo disminuyen por la actividad metabólica de las bacterias y por este motivo la viabilidad de estas empieza a disminuir. Además, el aumento inicial de bacterias implica un gasto más rápido de los nutrientes presentes en el medio (Parija, 2012; Parke et al., 2017).

Por este motivo, se ensayó el uso de [REDACTED] como protector celular y conservante. En este sentido, también se observan similitudes entre todos los formulados que incorporaron [REDACTED] en el medio. Estos formulados no mostraron aumento ni disminución de la población microbiana durante las primeras 20 semanas en ningún caso, y en algún caso se mantuvo hasta la semana 34. Esta estabilidad está mediada por el [REDACTED] ya que no se observó en los preparados sin este aditivo. El [REDACTED] es un protector celular, comúnmente utilizado en la conservación de microorganismos. Este aditivo se ha utilizado ampliamente como crioprotector en procesos de congelación, y en los últimos años como aditivo en medios líquidos (Hubálek, 2003). Este ensayo demuestra la capacidad del [REDACTED] para mantener la

estabilidad completa de los microorganismos en un medio líquido un mínimo de 5 meses. Además, la reducción de la concentración de microorganismos observada después de la semana 20 es más pausada que en los formulados sin este aditivo. De esta manera, se mantiene una concentración elevada de microorganismos durante un año. Otros estudios también han demostrado la eficacia del [REDACTED] como aditivo en cultivos líquidos, por ejemplo Manikandan et al., (2010) observaron una mejora significativa de la viabilidad de *P. fluorescens* durante 180 días al añadir [REDACTED] al medio. Además, Velineni & Brahma Prakash, (2011) reportaron que un medio con adición de [REDACTED] y polietilenglicol aumentaba la viabilidad de *B. [REDACTED]* tanto a temperatura ambiente, como sometido a estrés por alta temperatura o desecación.

5. Conclusión

La formulación de biofertilizantes es un paso clave para garantizar la viabilidad de los microorganismos a largo plazo. Las técnicas a emplear para mejorar la estabilidad del producto final dependen del estado físico del producto. De esta manera, según los resultados de este estudio, en los biofertilizantes sólidos, el uso de fertilizantes granulares como materiales portadores y la adición de los microorganismos pulverizados en el último estadio de fabricación del producto, procura una buena viabilidad de los microorganismos durante un año. Por otro lado, los biofertilizantes líquidos requieren de aditivos que mejoran la estabilidad de los microorganismos, en este caso la adición de [REDACTED] en el medio resultó en una mayor viabilidad de los microorganismos en todos los casos.

CAPÍTULO 3

ENSAYOS AGRONÓMICOS DE LOS BIOFERTILIZANTES DESARROLLADOS

CAPÍTULO 3: ENSAYOS AGRONÓMICOS DE LOS BIOFERTILIZANTES DESARROLLADOS

Resumen

Los biofertilizantes han demostrado ser de gran utilidad para aumentar la producción de los cultivos y/o la calidad de los frutos, y paralelamente reducir el impacto medioambiental del uso excesivo de fertilizantes. Por estos motivos, en los ensayos realizados se testaron la efectividad de los biofertilizantes desarrollados en cultivos. Los biofertilizantes 6-4-4 con [REDACTED] y P30 con *B.* [REDACTED] demostraron mejorar el rendimiento del cultivo del tomate independientemente de la dosis aplicada. Por otro lado, el biofertilizante N7 con *A.* [REDACTED] se testó en maíz, y se observó un aumento de nitratos en suelo gracias a *A.* [REDACTED]. Sin embargo, no se observó mejoras en el cultivo, debido a un alto contenido de nitratos en suelo al inicio del ensayo. Por último, se ensayaron dos biofertilizantes líquidos en plantas de tomate. En este sentido, MO con [REDACTED] mostró una mejora del rendimiento del cultivo y de la calidad de los frutos, debido a la mezcla de la materia orgánica y los microorganismos. No obstante, Superamino con [REDACTED] no alteró los parámetros de rendimiento ni calidad del fruto. En conclusión, 6-4-4 con [REDACTED] P30 con *B.* [REDACTED] y MO con [REDACTED] demostraron una mejora del cultivo del tomate. Mientras que N7 con *A.* [REDACTED] mostró una mejora en la disponibilidad de nitrógeno en suelo. De esta manera, los cuatro productos mencionados son útiles como biofertilizantes.

1. Introducción

Actualmente, la agricultura enfrenta dos desafíos importantes. Por un lado, se enfrenta a la necesidad de aumentar la producción agrícola, para abastecer una población en constante crecimiento. Por otro lado, el segundo desafío, se centra en la necesidad de reducir el impacto medioambiental que puede surgir de ciertas prácticas agrícolas, como el uso excesivo de fertilizantes químicos (Robertson & Swinton, 2005; United Nations General Assembly, 2015). Por estos motivos, es esencial la investigación de nuevas metodologías y productos para el desarrollo de una agricultura

que cumpla estos dos requisitos. En este sentido, el uso de biofertilizantes ha demostrado ser capaz de aumentar el rendimiento de los cultivos y/o la calidad de los frutos (Sudhakar et al., 2000; Lee et al., 2008; Bona et al., 2016). Además, los microorganismos aportados por los biofertilizantes permiten una mayor eficiencia de los nutrientes, permitiendo una reducción de la necesidad de aplicación de fertilizantes (Adesemoye & Kloepper, 2009; Adesemoye et al., 2009). Por estos motivos, el uso de biofertilizantes podría contribuir a lograr ambos objetivos. Debido a ello, la demanda de biofertilizantes ha aumentado en los últimos años y se prevé un crecimiento continuado durante la presente década (TechSci, 2020).

Por tal de lograr un biofertilizante efectivo para la mejora de los cultivos, una vez realizado el formulado y comprobada la viabilidad de los microorganismos en el producto final, se debe ensayar el abono en el cultivo objetivo. De esta manera, es esencial que los biofertilizantes desarrollados sean ensayados en cultivos modelo y de gran importancia en agricultura. En este sentido, la planta del tomate y el maíz son ejemplos de cultivos modelo y con gran relevancia mundial. Por un lado, la planta del tomate puede considerarse un modelo de las hortícolas. Además, el cultivo del tomate ha aumentado en las últimas décadas y en 2018 la producción mundial se situó en 180 millones de toneladas, implicando el uso de 5 millones de hectáreas de tierra cultivable (Kimura & Sinha, 2008; FAO, 2020). Por otro lado, el cultivo del maíz excede estas cifras, produciéndose casi 1150 millones de toneladas durante el año 2018, que implicaron 197 millones de hectáreas de tierra cultivable. Además, el maíz puede ser considerado una planta modelo que engloba los cereales. Por ello, estos dos cultivos son de especial interés para el ensayo de productos que mejoren la eficiencia de los nutrientes, aumenten la producción y/o mejoren la calidad de los frutos (Strable & Scanlon, 2009; FAO, 2020).

El objetivo de este capítulo es ensayar los biofertilizantes sólidos y líquidos desarrollados en el Capítulo 2 en cultivos (plantas de tomate o cultivo del maíz), y analizar el rendimiento del cultivo y la calidad de los frutos en cosecha.

2. Métodos

6-4-4 + [REDACTED] y P30 + *Bacillus* [REDACTED] en planta de tomate: Diseño experimental y muestreo

El ensayo se realizó en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Meyity), variedad de tomate pera, elegida para el estudio por su interés comercial y económico. Las semillas se compraron en la Cooperativa Agrícola del Vallés (Llerona, NE España). Las semillas se sembraron en sustrato de perlita, vermiculita y turba el 25 de febrero de 2019 y se cultivaron bajo un fotoperiodo largo (régimen de 16 h de luz / 8 h de oscuridad) en una cámara de ambiente constante (temperatura del aire entre 21 y 23°C y humedad relativa en torno al 65%). Seguidamente, el 11 de marzo de 2019, las plantas se transfirieron a multipots con el mismo sustrato y se mantuvieron en las mismas condiciones en la cámara de crecimiento. Posteriormente, el 26 de marzo de 2019 las plantas se transfirieron a macetas de 4L (una planta por maceta) con el mismo sustrato y se cultivaron en invernadero en la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona (Barcelona, NE España) hasta el final del período de estudio el 18 de junio de 2018. Después del trasplante, todas las plantas se regaron 2 veces al día con solución de Hoagland al 50% (Hoagland & Arnon, 1938). Las plantas se dividieron en seis grupos de 10 plantas cada uno: (1) Grupo tratado con fertilizante 6-4-4; (2) grupo tratado con fertilizante 6-4-4; (3) grupo tratado con fertilizante 6-4-4 + [REDACTED] a la mitad de dosis; (4) grupo tratado con fertilizante P30; (5) grupo tratado con fertilizante P30 + *B.* [REDACTED] y (6) grupo tratado con fertilizante P30 + *B.* [REDACTED] a la mitad de dosis.

TRATAMIENTO	DOSIS (g/planta)
6-4-4	60
6-4-4 + [REDACTED]	60
6-4-4 + [REDACTED] ½ dosis	30
P30	60
P30 + [REDACTED]	60
P30 + [REDACTED] ½ dosis	30

Tabla 3. Tratamientos y dosis del ensayo de efectividad de biofertilizantes sólidos en plantas de tomate.

Las dosis se especifican en la Tabla 3. Todos los tratamientos se realizaron dos veces, y en cada aplicación se administró el 50% de la dosis. La primera aplicación se realizó catorce días después del trasplante, el 9 de abril de 2019 y la segunda aplicación durante la antesis, el 24 de abril de 2019.

Para todos los tratamientos, se cosecharon todos los frutos los días 17 y 18 de junio de 2019 y se calculó la producción por planta (kg de tomate/planta) y el peso fresco y seco por tomate. Además, 6 tomates de cada planta fueron utilizados para analizar los TSS, TA y la relación TSS/TA.

N7+ Azotobacter [REDACTED] en maíz: Diseño experimental y muestreo

El ensayo se realizó en maíz (*Zea mays* var. Pioner 1570, de ciclo FAO 700), variedad de maíz altamente productiva. El ensayo se llevó a cabo en TM Almacelles (Lérida, España). Las semillas se sembraron el 23 de abril de 2019. Posteriormente, se dividió la parcela en cuatro bloques de estudio según el tratamiento: (1) grupo control, sin tratamiento; (2) grupo tratado con fertilizante N7; (3) grupo tratado con fertilizante N7 + A. [REDACTED] y (4) grupo tratado con fertilizante N10. La dosis aplicada fue de 2140 kg/ha en todos los casos y cada tratamiento se ensayó en tres áreas diferenciadas de 10m² cada una, distribuidas de forma aleatoria (Tabla 4).

BLOQUE I	N10	N7	C	N7 ⁺
BLOQUE II	C	N7 ⁺	N7	N10
BLOQUE III	N7	C	N10	N7 ⁺

Tabla 4. Distribución aleatoria de áreas de ensayo de biofertilizante en maíz. C: Control; N7⁺: N7 + A. [REDACTED]

Seguidamente, el 21 de mayo de 2019, se realizó un muestreo de suelo (profundidad 0-35 cm) de cinco ubicaciones distintas de cada área de tratamiento, que posteriormente se homogenizaron y se utilizaron para analizar la cantidad de nitratos en suelo al inicio del ensayo. A continuación, se aplicaron los tratamientos descritos anteriormente. Pasado un mes, el 25 de junio de 2019, momento en que el cultivo se encontraba en estadio V5-V6 (5-6 hojas abiertas), se realizó un segundo muestreo de nitratos en suelo, con la misma metodología descrita anteriormente. Seguidamente, el 17 de julio de 2020 se llevó a cabo el muestreo de hojas en estadio de floración para analizar el nitrógeno. Se muestreó la hoja opuesta a la mazorca de 10 plantas por área de tratamiento. Finalmente, el 4 de octubre de 2019 se recogió muestra del tallo de 10 plantas por área de tratamiento. Las muestras corresponden a la parte basal del tallo (entre los 15 y 35 cm), y se recogieron para analizar la cantidad de nitrógeno presente. El mismo día se realizó la cosecha. Se analizó la cantidad de nitrógeno en grano de maíz y se pesaron las mazorcas de maíz.

MO + [REDACTED] y Superamino + [REDACTED] en planta de tomate: Diseño experimental y muestreo

El ensayo se realizó en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Meyity), variedad de tomate pera, elegida para el estudio por su interés comercial y económico. Las semillas se compraron en la Cooperativa Agrícola del Vallés (Llerona, NE España). Las semillas se sembraron en sustrato de perlita, vermiculita y turba el 23 de enero de 2020 y se cultivaron bajo un fotoperiodo largo (régimen de 16 h de luz / 8 h de oscuridad) en una cámara de ambiente constante (temperatura del aire entre 21 y 23°C y humedad relativa en torno al 65%). El 6 de febrero de 2020, las plantas se transfirieron a multipots con el mismo sustrato y se mantuvieron en las mismas condiciones en la cámara de crecimiento hasta el 19 de marzo de 2020. Seguidamente, las plantas se transfirieron a macetas de 4L (una planta por maceta) con el mismo sustrato y se cultivaron en invernadero en la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona (Barcelona, NE España) hasta el final del período de estudio el 2 de junio de 2018. Después del trasplante, todas las plantas se regaron dos veces por día con solución Hoagland al 50% (Hoagland & Arnon, 1938). Las plantas se dividieron en 6 grupos de 10 plantas: (1) Grupo control, sin ningún tratamiento; (2) grupo tratado con MO; (3) grupo tratado con MO y [REDACTED] (4) grupo tratado con Superamino; (5) grupo tratado con Superamino y [REDACTED] y (6) grupo tratado con [REDACTED]. Las dosis aplicadas se presentan en la Tabla 5. Todos los tratamientos se realizaron dos veces, la primera el 4 de marzo de 2020 y la segunda el 11 de marzo de 2020.

Tratamiento	Dosis (ml/L)
Control	-
MO	60
MO + [REDACTED]	60
Superamino	45
Superamino + [REDACTED]	45
[REDACTED]	1'5

Tabla 5. Tratamientos y dosis del ensayo de efectividad de biofertilizantes líquidos en plantas de tomate.

Para todos los tratamientos, se cosecharon todos los frutos los días 1 y 2 de junio de 2020 y se calculó la producción por planta (kg de tomate/planta) y el peso

fresco y seco por tomate. Además, 6 tomates de cada planta fueron utilizados para analizar los TSS, TA y relación TSS/TA.

Parámetros de rendimiento y calidad del tomate

La producción total de frutos por planta se midió en la primera cosecha. Además, se analizó el peso fresco y el peso seco de los tomates pesando los frutos recién cosechados. Por otro lado, la calidad del tomate se determinó midiendo los TSS, la TA y la relación TSS / TA. Para el análisis de la calidad de la fruta se extrajo jugo de tomate. Se utilizó un ml de jugo para determinar el TSS utilizando un refractómetro digital HI 96,801 (HANNA instruments, Woonsocket, EE.UU.). Además, se diluyeron 10 mL de jugo con 100 mL de agua destilada y esta solución se utilizó para la determinación de TA con NaOH 0.1 N, utilizando como indicador fenolftaleína (1%) (Latimer, 2016).

Análisis de nitrógeno en suelo, tallo y grano y rendimiento del cultivo del maíz

El análisis de nitratos en suelo y tallo se realizó secando las muestras tanto de suelo como de planta y posteriormente triturándolas. Seguidamente los nitratos se extrajeron en agua destilada en una proporción 1:5 p/p. La determinación de los nitratos se realizó llevando a cabo una reducción de nitratos a nitritos y posteriormente estos se valoraron a través de espectrofotometría ultravioleta visible (Bastian et al., 1957; Norman & Stucki, 1981).

Por otro lado, el análisis de nitrógeno en hoja y grano se realizó a través de la metodología Kjeldahl, según está descrito por Bremner, (1960).

Finalmente, en el momento de cosecha se pesaron las mazorcas de maíz de cada tratamiento y se calculó la producción en kg/ha.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza factorial de una vía (ANOVA), seguido de pruebas post hoc de Tukey HSD, utilizando IBM® SPSS® Statistics 19 (Armonk, NY). Las diferencias se consideraron significativas a un nivel de probabilidad de $p < 0,05$.

3. Resultados

6-4-4 + [REDACTED] y P30 + Bacillus
[REDACTED] en planta de tomate

Por un lado, los resultados muestran que el tratamiento con biofertilizante 6-4-4 + [REDACTED] independientemente de la dosis aplicada, no produce diferencias significativas en los parámetros de calidad del tomate, en comparación con las plantas únicamente tratadas con fertilizante 6-4-4 sin microorganismos. Es decir, los TSS (Fig. 10A), la TA (Fig. 10B) y la relación TSS/TA (Fig. 10C) se mantienen similares en los grupos tratados con 6-4-4, 6-4-4 + [REDACTED] y 6-4-4 + [REDACTED] a mitad de dosis. Sin embargo, el rendimiento del cultivo si se ve afectado por la adición de microorganismos. El peso fresco de los tomates aumenta un 18% en las plantas tratadas con 6-4-4 + [REDACTED] y un 19% en las tratadas con este biofertilizante a mitad de dosis (Fig. 9A). De manera similar, el peso seco de los frutos aumenta un 17% y un 19% en las plantas a

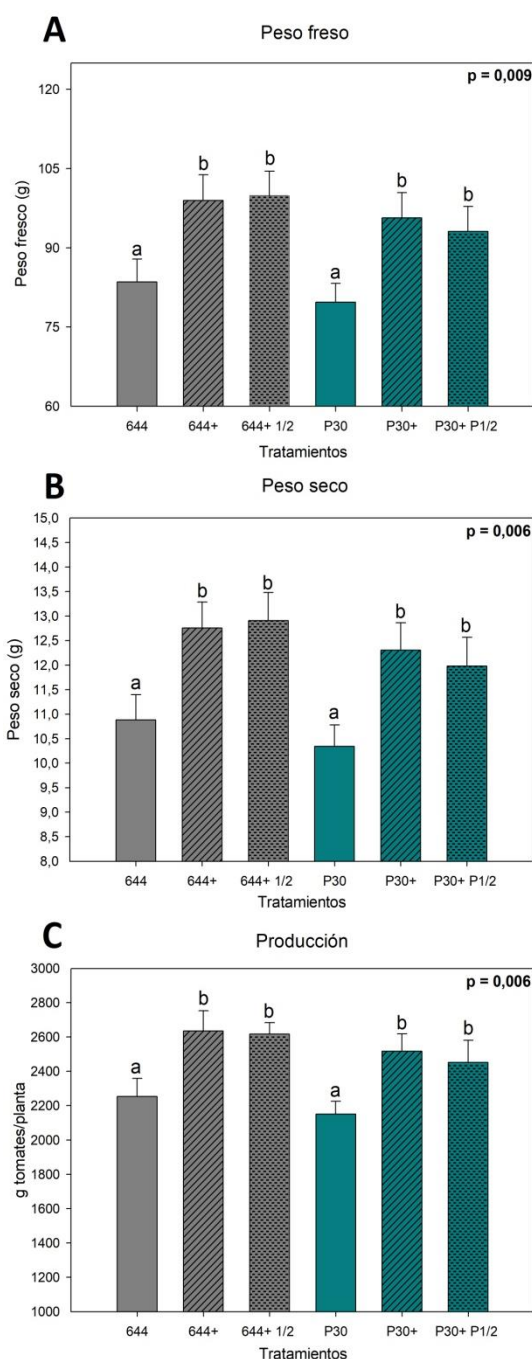


Figura 9. Rendimiento del cultivo en plantas de tomate según el tratamiento. A) Peso fresco, B) Peso seco y C) Producción. 644+: Fertilizante 644 + [REDACTED] P30+: Fertilizante P30 + B. [REDACTED] ½: 50% de la dosis.

las que se les aplicó 6-4-4 + [redacted] y este biofertilizante a mitad de dosis, respectivamente (Fig. 9B). Además, la producción por planta se incrementa un 13% para las plantas tratadas con el biofertilizante a la misma dosis y un 12% en las tratadas con el biofertilizante a la mitad de la dosis (Fig. 9C).

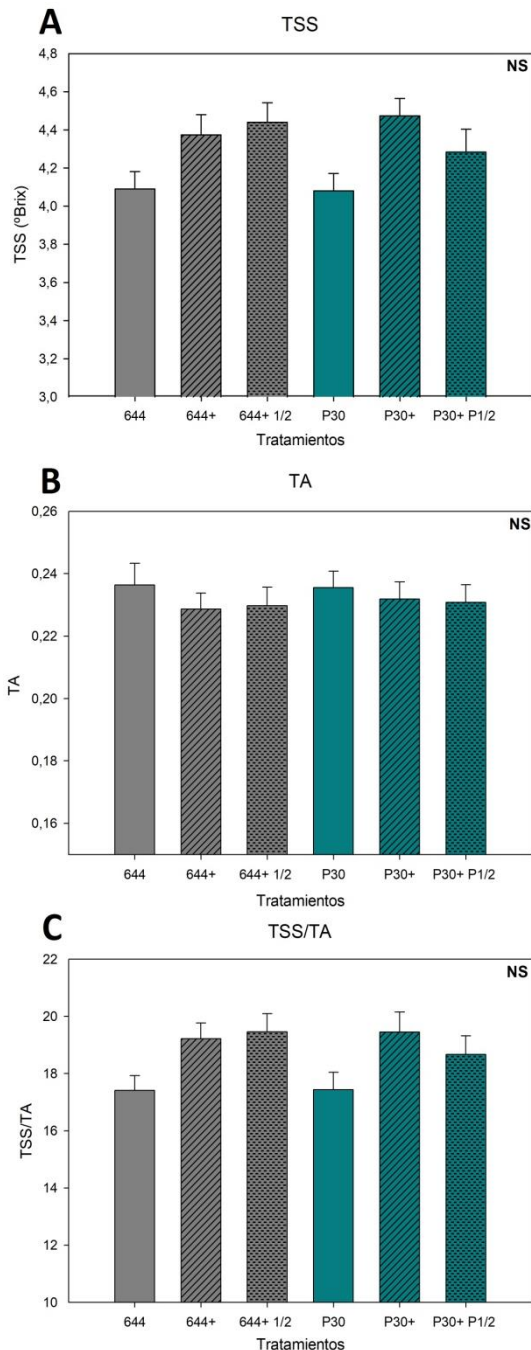


Figura 10. Calidad del fruto en plantas de tomate según el tratamiento. A) TSS, B) TA y C) TSS/TA. 644+: Fertilizante 644 + [redacted] P30+: Fertilizante P30 + B. [redacted] 1/2: 50% de la dosis.

Por otro lado, las plantas tratadas con P30 y P30 + B. [redacted] en cualquiera de las dosis no presentan diferencias significativas en el TSS (Fig. 10A), TA (Fig. 10B), ni la relación TSS/TA (Fig. 10C). No obstante, el rendimiento del cultivo aumenta gracias a la aplicación de B. [redacted] El peso fresco del fruto se incrementa un 20% con la adición de biofertilizante a la misma dosis y un 17% cuando el biofertilizante se aplica a mitad de dosis (Fig. 9A). Además, el peso seco aumenta un 19% y 16% al aplicar el biofertilizante a misma dosis y mitad de dosis, respectivamente (Fig. 9B). Esto conlleva un incremento de la producción por planta de un 17% con P30 + B. [redacted] y de un 15% con P30 + B. [redacted] a mitad de dosis (Fig. 9C).

N7+ Azotobacter [redacted] en maíz

Primeramente, el análisis de nitratos en suelo al inicio del ensayo muestra que en todos los casos el nivel de nitratos en suelo es alto y similar entre áreas. Seguidamente, el análisis de nitratos en suelo realizado cuando el cultivo se encuentra en estadio V5 muestra el efecto de los tratamientos en el suelo un mes

posterior a su aplicación. En este sentido, el grupo control, al que no se le aplicó ningún tratamiento, muestra una reducción de nitratos en suelo del 20%.

Por otro lado, se observa que la aplicación de fertilizante N7 permite mantener la cantidad de nitratos en suelo un mes después de su aplicación. Por último, el área de aplicación de fertilizante N7 + *Azotobacter* muestra un aumento del 36% de nitratos en suelo, mientras que el área tratada con N10 muestra un aumento del 24% (Fig. 11).

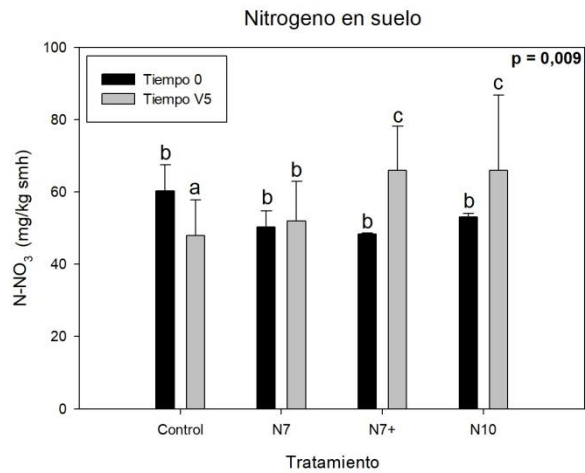


Figura 11. Nitratos en suelo antes de aplicar tratamientos y estadio V5 de las plantas de maíz según tratamientos. N7+: Fertilizante N7 + A.

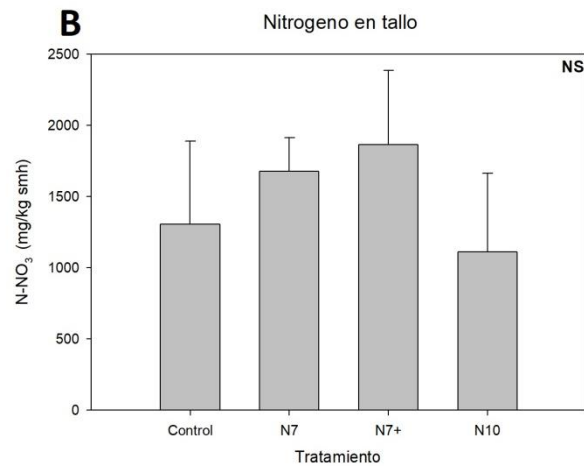
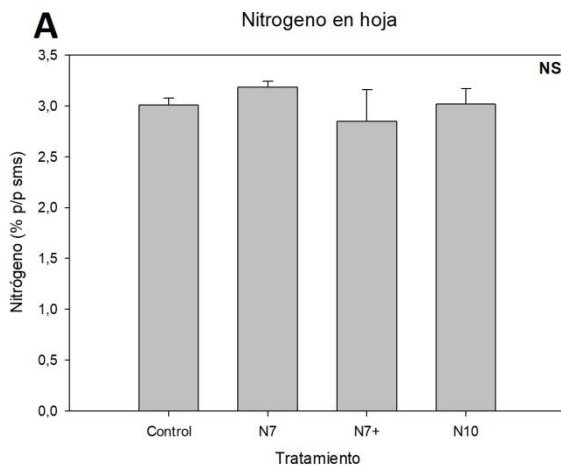


Figura 12. Nitrógeno en maíz según el tratamiento. A) Nitrógeno en hoja; B) Nitrógeno en tallo. N7+: Fertilizante N7 + A.

Sin embargo, los resultados de nitrógeno en hoja y tallo no muestran diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Fig. 12). De la misma manera, las diferencias de nitrógeno en grano en cosecha no resultan significativas (Fig. 13A). Por último, la producción (kg/ha) no muestra diferencias significativas entre el grupo control y los distintos tratamientos (Fig. 13B).

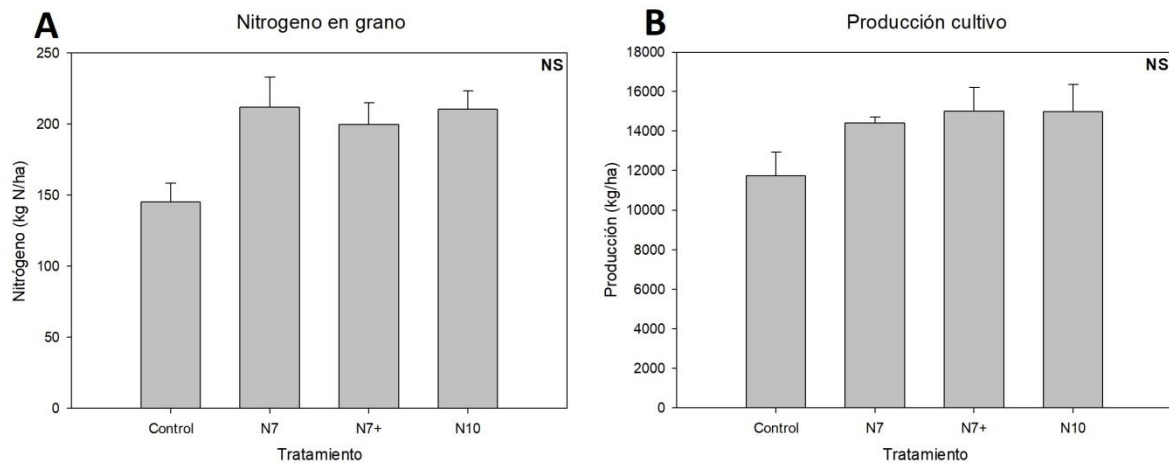


Figura 13. Nitrógeno en grano en el estado de cosecha y producción del cultivo del maíz según el tratamiento. N7+: Fertilizante N7 + A. [REDACTED]

MO+ [REDACTED] y Superamino + [REDACTED] en planta de tomate

Los resultados obtenidos muestran que los TSS en tomate se ven afectados significativamente en las plantas tratadas con MO + [REDACTED] resultando en un aumento del 9% en comparación con el grupo control. La aplicación de otros fertilizantes no resulta en un cambio significativo de este parámetro (Fig. 14A). Por otro lado, la TA no muestra diferencias significativas en ningún tratamiento (Fig. 14B). Estos parámetros implican que la TSS/TA se incrementa un 15% en el grupo al que se le aplicó MO + [REDACTED] mientras que no se ve afectada por otros tratamientos (Fig. 14C). Sin embargo, entre las plantas tratadas con MO + [REDACTED] y aquellas tratadas únicamente con MO, no se observan diferencias significativas en cuanto a los parámetros de calidad.

Por otro lado, el peso fresco y el peso seco del tomate muestra cambios únicamente en el grupo tratado con MO + [REDACTED]. En el caso del peso fresco aumenta un 39% en comparación con el grupo control y un 20% en comparación con plantas tratadas con MO (Fig. 15A). Asimismo, el peso seco se incrementa un 36% en comparación con las plantas control y un 19% en comparación con las plantas tratadas con MO (Fig. 15B). Finalmente, la producción del cultivo también muestra diferencias significativas en este grupo, en relación al grupo control y al grupo tratado con MO, aumentando un 26% y un 20%, respectivamente. No obstante, los grupos tratados con

Superamino, Superamino + [redacted] o [redacted] no muestran diferencias significativas en el rendimiento del cultivo (Fig. 15C).

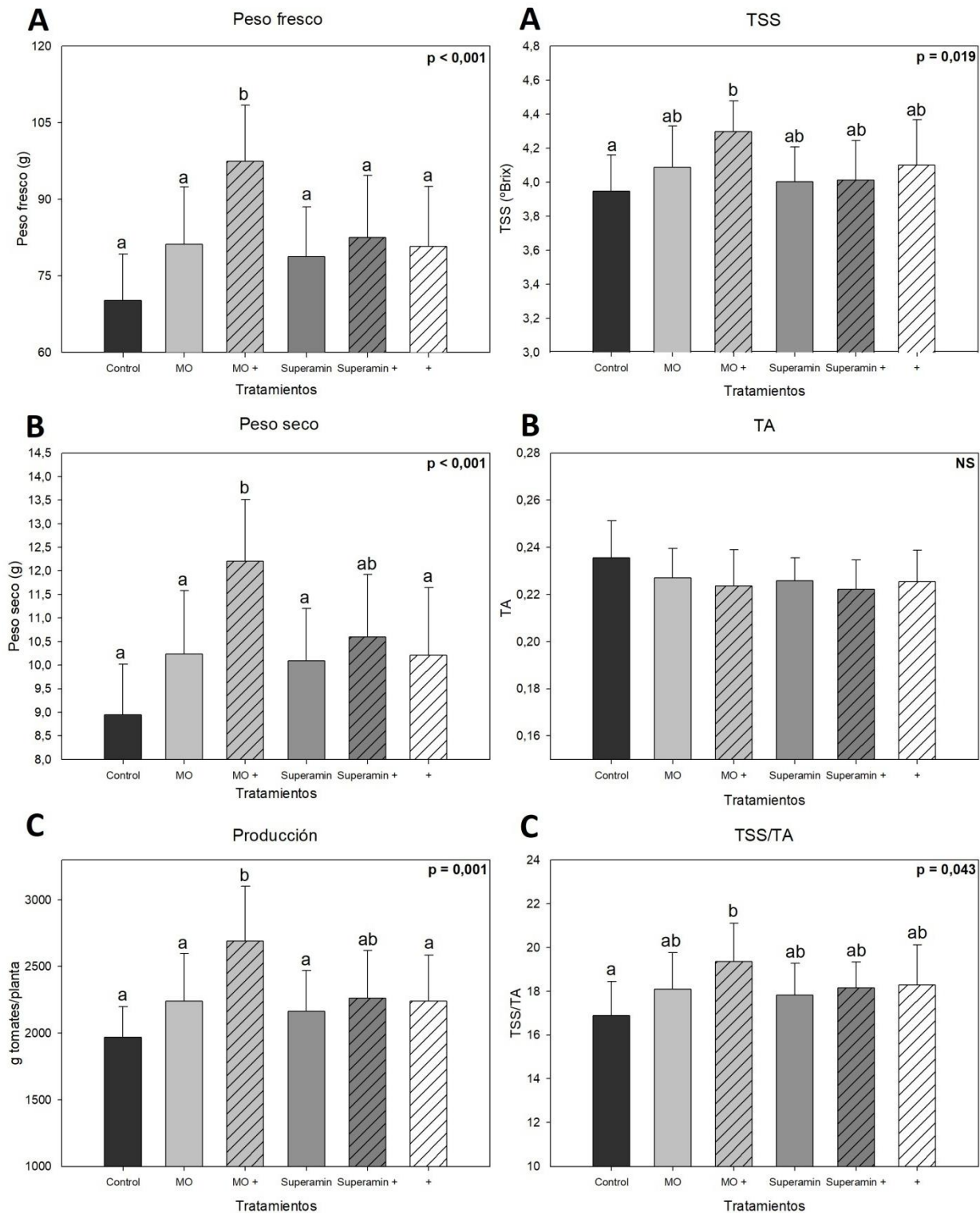


Figura 14. Rendimiento del cultivo en plantas de tomate según el tratamiento. A) Peso fresco, B) Peso seco y C) Producción. +: [redacted]

Figura 15. Calidad del fruto en plantas de tomate según el tratamiento. A) TSS, B) TA y C) TSS/TA. +: [redacted]

4. Discusión

6-4-4 + [REDACTED] y P30 + *Bacillus* [REDACTED] en planta de tomate

Los resultados del ensayo mostraron que los formulados 6-4-4 + [REDACTED] y P30 + *B.* [REDACTED] producen efectos similares en el rendimiento del cultivo del tomate. En ambos casos se observa un aumento del peso fresco, peso seco y producción por planta. Este efecto se produce tanto en la aplicación de los biofertilizantes a la misma dosis que los fertilizantes sin microorganismos, como cuando los biofertilizantes se aplican a la mitad de dosis. Estos resultados indican que el uso de los microorganismos seleccionados para cada uno de los dos fertilizantes mejoran la efectividad de estos. Por un lado, *A. salinestris*, *B.* [REDACTED] y *F.* [REDACTED] mejoran la efectividad del fertilizante 6-4-4. Este efecto observado, probablemente se debe a la producción de estos microorganismos de PGRs y su efecto en la disponibilidad de nutrientes. Por un lado, *A. salinestris* ha demostrado ser productora de IAA, giberelinas y ACC-deaminasa, además de ser una bacteria fijadora de nitrógeno (Omer et al., 2016). Por otro lado, *B.* [REDACTED] está implicado en la solubilización de fósforo y *F.* [REDACTED] es capaz de movilizar el potasio (Pindi & Satyanarayana, 2012; Wyciszkievicz et al., 2017). Estas características promueven el aumento del rendimiento del cultivo del tomate.

Por otro lado, *B.* [REDACTED] mejora la eficiencia del fertilizante P30. Esto es debido a la habilidad de esta bacteria de solubilizar el fósforo. En este caso, el fertilizante P30 está compuesto de un 30% de fosfato de roca, es decir, una fuente de fósforo inorgánico insoluble. La unión de este fertilizante con *B.* [REDACTED] podría permitir la solubilización de este fosfato gracias a la producción de ácidos orgánicos por parte de *B.* [REDACTED] (Wyciszkievicz et al., 2017). De esta forma las plantas tratadas con P30 + *B.* [REDACTED] obtendrían una fuente de fósforo disponible. Por este motivo, se cree que gracias a este aumento en la disponibilidad de fósforo las plantas mejoran el rendimiento. En este sentido, Han & Lee, (2005) reportaron un aumento de la disponibilidad de fósforo al inocular *B.* [REDACTED] juntamente con fosfato de roca en plantas de berenjena. Además, estas plantas resultaban en un mayor peso seco de raíces y brotes. Por otro lado, resultados similares a los encontrados en este estudio han sido descritos por El-Yazeid & Abou-Aly, (2011) que

observaron un aumento de la producción del cultivo del tomate al inocular *B.* [REDACTED]

Además, se observa que la reducción de biofertilizante a la mitad de dosis no afecta a los efectos beneficiosos de estos microorganismos en el cultivo. Estos resultados muestran que los microorganismos adicionados en ambos casos permiten reducir la dosis de nutrientes a la mitad, sin que implique un efecto negativo en la planta. La posibilidad de reducir la aportación de nutrientes, gracias a los microorganismos, coincide con los resultados reportados por El-Kholy et al., (2005), que observaron que la inoculación de *Azospirillum brasilense* y/o *Rhodotorula glutinis* permitía reducir la dosis de NPK al 50%, manteniendo los parámetros de crecimiento y rendimiento de la planta del maíz. Además, se han observado resultados similares en el uso de bacterias solubilizadoras de fósforo como *B.* [REDACTED]. En este sentido, Sundara et al., (2002) demostraron que el uso de esta bacteria, en cultivos de caña de azúcar, permitía reducir la dosis de fósforo un 25%. Además, Yazdani et al., (2009) también reportaron que la inoculación con diversas bacterias en maíz (*A. corooococum*, *A. brasilense*, *P. putida* y *B. lentus*) permitía la reducción de fósforo al 50%, sin efecto significativo en el rendimiento del cultivo. De la misma manera, en el presente estudio se observa que la adición de microorganismos permite reducir la dosis de fertilizante al 50%, permitiendo simultáneamente una mejora en el rendimiento del cultivo del tomate.

N7+ *Azotobacter* [REDACTED] en maíz

Los resultados de nitratos en suelo al inicio del ensayo y en el estadio V5 del cultivo, mostraron como actuó cada tratamiento en el aporte de nitrógeno, durante el mes posterior a su aplicación. Primeramente, en el grupo control disminuyó la cantidad de nitratos en suelo, esto es debido a que no se aplicó ningún aporte de este nutriente al suelo. La disminución de nitratos fue del 20%, y esta se puede deber a dos factores. Por un lado, los nitratos son asimilados por la planta, ya que esta se encuentra en fase de crecimiento y demanda de nitrógeno disponible constante. Por otro lado, el nitrato residual en suelo también puede padecer un proceso de lixiviación, filtrándose a aguas subterráneas, o un proceso de desnitrificación, transformándose el nitrato en N_2 atmosférico, debido a la acción de ciertos microorganismos (McNeill & Unkovich, 2007; Groffman, 2012; Cameron et al., 2013).

Seguidamente, se observa que la aplicación de fertilizante N7 cambia la tendencia de disminución de nitratos en suelo, ya que en este caso los nitratos se mantienen estables. Este resultado indica que el fertilizante N7 es capaz de cubrir la reducción de nitratos, de aproximadamente un 20%, causada por la asimilación de este nutriente por la planta y/o por procesos de lixiviación o desnitrificación. Por otro lado, la aplicación de N7 + A. [REDACTED] o N10 permiten satisfacer las necesidades de nitrógeno del cultivo durante el primer mes de crecimiento. Además, aumentan los nitratos en suelo, es decir, su aporte de nitrógeno es superior a las necesidades del maíz en esta primera etapa. En este sentido, N7 + A. [REDACTED] mostró un aumento del 36%, en comparación con el fertilizante N7 con microorganismos que mantuvo la cantidad de este nutriente en suelo. Este resultado indica que el aumento de nitratos se debió al efecto de A. [REDACTED]. Esta bacteria ha demostrado anteriormente su capacidad como fijadora de nitrógeno, habilidad que permite reducir la cantidad de nitrógeno aplicado a través de fertilizantes químicos gracias a su efecto (Nosrati, 2014; Nosheen & Bano, 2014). Por último, el tratamiento con N10 resultó en un incremento de nitratos en suelo del 24%. Este aumento es debido al mayor aporte de nitrógeno de este fertilizante en comparación con el fertilizante N7. Finalmente, la comparación de los suelos tratados con N7 + A. [REDACTED] y N10 demuestra que el efecto de A. [REDACTED] es capaz de suplir el aporte menor de nitrógeno del fertilizante N7 en comparación con N10.

Sin embargo, el aumento de nitratos en el suelo tras la aplicación de N7 + A. [REDACTED] o N10, no resulta en diferencias significativas en la cantidad de nitrógeno en tallo, hoja o grano o en la producción del cultivo. Esto, probablemente es debido a la alta cantidad de nitratos en suelo al inicio del ensayo, es decir, aunque el aporte de nitrógeno a través de los fertilizantes y de la bacteria A. [REDACTED] aumentan la cantidad de nitratos en suelo, estos no son utilizados por la planta, debido a que la planta cuenta con nitratos en exceso para su desarrollo. No obstante, estos resultados muestran que la combinación de N7 con A. [REDACTED] sería de utilidad para el cultivo del maíz en suelos pobres en nitrógeno, ya que permite el correcto desarrollo del maíz, y un aumento de nitratos en suelo en un mes. Por otro lado, en suelos con niveles óptimos de nitrógeno, esta combinación permitiría reducir la dosis de fertilizante y por tanto disminuir el aporte de nitrógeno a través de fertilizantes químicos.

MO+ [REDACTED] y Superamino + [REDACTED] en planta de tomate

Los resultados muestran un efecto significativo en las plantas tratadas con MO + [REDACTED]. Además, los cambios observados en las plantas tratadas con MO + [REDACTED] muestran un efecto conjunto de la materia orgánica y los microorganismos. En este sentido, se observa que los parámetros de calidad (TSS y TSS/TA) mejoran en el caso de la unión de materia orgánica y microorganismos, en comparación con las plantas control. Por otro lado, el rendimiento de las plantas a las que se les aplicó MO + [REDACTED] aumentó, en relación tanto al grupo control como al grupo al que se le aplicó únicamente MO. Sin embargo, no se observa una diferencia significativa en ninguno de los parámetros analizados en las plantas tratadas únicamente con MO, ni en aquellas tratadas únicamente con [REDACTED]. Estos resultados parecen indicar que el uso de MO con esta mezcla de microorganismos posee un efecto sinérgico, ya que ambos componentes por separado no muestran un efecto significativo en la planta, pero al administrarlos en conjunto mejoran la calidad de los frutos y el rendimiento del cultivo. Este efecto no sucede cuando los microorganismos se aplican con el fertilizante Superamino, basado en aminoácidos. Por este motivo, podría haber una interacción entre la materia orgánica y los microorganismos. En este sentido, la presencia de materia orgánica en el medio se ha relacionado en diversas ocasiones con un mayor crecimiento de los microorganismos, dado que esta posee sustancias que los microorganismos son capaces de metabolizar (Pera et al., 1983; Mohammadi et al., 2011). Por estos motivos, al aplicar los microorganismos en conjunto con la materia orgánica se podría potenciar la activación de estos en el suelo, de manera que se observara un efecto mayor en la planta.

Por otro lado, en referencia a los microorganismos, como se ha descrito anteriormente, [REDACTED] está compuesto por tres bacterias con distintas propiedades: (1) *A. salinestris*, bacteria fijadora de nitrógeno y productora de PGRs (IAA, giberelinas y ACC-deaminasa) (Omer et al., 2016); (2) *B.* [REDACTED] bacteria solubilizadora de fósforo (Wyciskiewicz et al., 2017) y (3) *F.* [REDACTED] bacteria movilizadora de potasio (Pindi & Satyanarayana, 2012).

De esta manera, *A. salinestris*, *B.* [REDACTED] y *F.* [REDACTED] aplicadas juntamente con el fertilizante basado en materia orgánica, podría ser un biofertilizante de gran utilidad en las plantas de tomate. No obstante, serían necesarios más estudios

para determinar la posible interacción de la materia orgánica y los microorganismos y la relación con la mejora del cultivo del tomate.

5. Conclusión

En conclusión, la adición de ciertos microorganismos beneficiosos en agricultura a los fertilizantes puede mejorar su eficacia. En este sentido, *A. salinestris*, *B. [REDACTED]* y *F. [REDACTED]* mejoran la efectividad del fertilizante 6-4-4 en plantas de tomate, mejorando el rendimiento del cultivo. De la misma manera, *B. [REDACTED]* mejora la eficacia del fertilizante P30, mejorando el rendimiento del cultivo del tomate. Por otro lado, las bacterias *A. salinestris*, *B. [REDACTED]* y *F. [REDACTED]* también muestran una mejora de las plantas de tomate cuando se adicionan al fertilizante MO. Finalmente, la adición de *A. [REDACTED]* al fertilizante N7 mejora la cantidad de nitratos en suelo. Estos resultados muestran los beneficios del uso de microorganismos en la mejora del rendimiento de los cultivos y la calidad de los frutos y/o la posibilidad de reducir la cantidad de nutrientes aportados a través de fertilizantes químicos sin afectar estos parámetros.

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

1. Aspectos fundamentales del desarrollo de biofertilizantes

El proceso de desarrollo de biofertilizantes consta de diversas etapas, indispensables para asegurar la eficiencia final del producto. Esencialmente, el proceso se divide en tres etapas diferenciadas, que engloban varios pasos (Fig. 16):

1. La selección del microorganismo o microorganismos que formaran el inóculo.
2. El formulado del inóculo con el material o materiales portadores, y posteriormente el estudio de viabilidad de los microorganismos en los formulados.
3. Ensayos agronómicos de los biofertilizantes en cultivos.

Finalmente, se deben analizar los resultados del proceso global y si estos son favorables proceder al registro y posterior comercialización del biofertilizante desarrollado. Todas las etapas descritas poseen aspectos fundamentales que se deben considerar durante el desarrollo de los biofertilizantes (Bashan, 1998; Malusá et al. 2012; Bashan et al., 2013).



Figura 16. Pasos fundamentales en el desarrollo de biofertilizantes: 1) Selección de microorganismos; 2) Formulado del biofertilizante; 3) Ensayos de biofertilizantes; 4) Análisis resultados, registro y comercialización.

1.1. Selección de microorganismos

El primer paso en el desarrollo de biofertilizantes es seleccionar el microorganismo o microorganismos que formaran el inóculo. En este sentido, se debe estudiar previamente las necesidades actuales de la agricultura. Hoy en día, la agricultura sufre un descenso de las tierras cultivables debido a una disminución de la fertilidad de la tierra (Global Footprint Network, 2019). Además, se ha descrito anteriormente, que parte del nitrógeno y fósforo aportados se inmovilizan en el suelo, no siendo accesible para las plantas. Por otro lado, los nutrientes no utilizados por las plantas, pueden formar lixiviados que contaminan aguas subterráneas (Basosi et al., 2014). En este sentido, los microorganismos fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fósforo son de gran utilidad en agricultura, ya que permiten utilizar los nutrientes de forma más eficiente y reducir esta problemática (Adesemoye & Kloepper, 2009). Además, debido al aumento continuado de la población mundial, es necesario aumentar la producción de los cultivos sin reducir la calidad de los frutos (United Nations General Assembly, 2015; United Nations, 2019). Por estos motivos, los microorganismos productores de PGRs, o otros métodos de acción que permitan un aumento del rendimiento del cultivo, serán importantes para solucionar la problemática actual en agricultura.

Teniendo en cuenta estos aspectos, se seleccionó un microorganismo fijador de nitrógeno, un microorganismo solubilizador de fósforo y un microorganismo promotor del crecimiento vegetal (Capítulo 1). Por otro lado, se estudió también una mezcla de microorganismos, que posea microorganismos de los tres grupos comentados. Seguidamente, es importante conocer las características de los microorganismos, no únicamente sus habilidades como PGPMs, si no en cuanto a su crecimiento. En este sentido, lo más importante es conocer si los microorganismos poseen formas de resistencia, como son las esporas o quistes. Estas formas de resistencia se activan en las bacterias frente a unas condiciones ambientales adversas, permitiendo que el microorganismo sobreviva y se mantenga en un estado de latencia (Setlow, 2007). Los microorganismos con esta capacidad son muy interesantes para el desarrollo de biofertilizantes, ya que permite una mejor viabilidad del microorganismo durante el proceso de producción del fertilizante y durante el almacenaje, transporte y distribución del producto (Omer, 2010). En el caso de formular biofertilizantes con

microorganismos que no posean formas de resistencia, será importante conocer el rango de temperatura y pH que permite la supervivencia del microorganismo, por tal de posteriormente poder formular un producto que permita la viabilidad del inóculo. En este sentido, se utilizó la bacteria *B.* [REDACTED] por ser formadora de esporas y *A.* [REDACTED] por formar quistes resistentes (Sadoff, 1975; Nicholson et al., 2000).

Una vez seleccionados, es imprescindible ensayar su eficacia en cultivos de interés agronómico. En este sentido, se ensayaron los microorganismos en plantas de tomate. Los resultados mostraron efectos positivos de los tres microorganismos ensayados, en el rendimiento del cultivo y/o la calidad de los frutos. Sin embargo, *A.* [REDACTED] fue el único en mostrar efectos positivos tanto en el rendimiento del cultivo como en la calidad del fruto en cosecha. Por este motivo, se escogió para el desarrollo de biofertilizantes. Por otro lado, *B.* [REDACTED] mostró el mayor aumento en el rendimiento del cultivo, entre los tres microorganismos ensayados, y por ello también se escogió para el desarrollo de biofertilizantes. Finalmente, *P.* [REDACTED] pese a mostrar un aumento en el rendimiento del cultivo no fue escogido, debido a que se decidió cambiar la estrategia por una mezcla de microorganismos con diversas funciones, para el desarrollo de un biofertilizante promotor del crecimiento vegetal.

En resumen, en esta primera fase es fundamental escoger el microorganismo o microorganismos dependiendo de las necesidades de la agricultura y de los cultivos diana. En este sentido, es esencial testar la eficacia de los microorganismos en el cultivo o cultivos de interés.

1.2. Formulado y estabilidad el biofertilizante

La segunda etapa se basa en el formulado del biofertilizante, que consta del inóculo ya seleccionado y una o varias sustancias portadoras que faciliten la viabilidad del microorganismo y la eficacia de este. En esta etapa, se debe escoger el material portador según el estado físico final del producto, ya que tanto los biofertilizantes sólidos como los biofertilizantes líquidos poseen diversas ventajas y limitaciones. En el caso de biofertilizantes sólidos, muestran una viabilidad elevada de los microorganismos a largo plazo debido a la reducción de la humedad, tal y como se observa en los resultados del Capítulo 2. En este ensayo, se observó que los tres biofertilizantes sólidos desarrollados mostraban una viabilidad elevada de los

microorganismos, durante un año de estudio. La estabilidad en la concentración de microorganismos viables fue debida al uso de microorganismos que poseían formas de resistencia, como son los quistes o esporas, de manera que al reducir la humedad del medio los microorganismos se mantuvieron en un estado de latencia (Setlow & Kornberg, 1970). Sin embargo, los fertilizantes sólidos implican una necesidad mayor de espacio de almacenaje y de transporte, ya que ocupan un volumen mayor que los líquidos.

Por otro lado, se encuentran los biofertilizantes líquidos. Este tipo de biofertilizantes no permite la estrategia anteriormente descrita para mantener la viabilidad de los microorganismos. Por este motivo, los microorganismos incorporados en un medio líquido pueden ser poco estables y perder la viabilidad en las primeras 6 a 10 semanas, como se muestra en los resultados del Capítulo 2. No obstante, se pueden abordar soluciones para mantener la viabilidad de los microorganismos durante un periodo mayor. En este sentido, el uso del aditivo [REDACTED] posee un efecto de protector celular, de manera que los resultados mostraron que en todos los casos en los que se incorporó [REDACTED] al medio la concentración de microorganismos fue estable durante las primeras 20 a 34 semanas, y posteriormente la población de microorganismos se redujo lentamente. De esta manera, el [REDACTED] permitió alargar la vida útil de los biofertilizantes. El uso de [REDACTED] y otros aditivos es de gran utilidad para mantener la viabilidad de los microorganismos en biofertilizantes (Manikandan et al., 2010; Velineni & Brahmaprakash, 2011; Vassilev et al., 2017). Además, los biofertilizantes líquidos, contrariamente a los sólidos, tiene una menor necesidad de espacio de almacenaje y distribución.

Por último, es importante conocer las funciones del material portador. En este caso, se escogió utilizar fertilizantes granulares o líquidos, que aportaran distintos nutrientes en cada caso. Esta opción permite proporcionar en un solo producto los nutrientes necesarios en conjunto con los microorganismos, de manera que los nutrientes serán utilizados más eficientemente por las plantas. Esta estrategia se escogió debido a que los microorganismos han demostrado mejorar la eficacia de los nutrientes, mejorando la disponibilidad de nutrientes para las plantas, y permitiendo así reducir la cantidad de fertilizantes necesarios (Di Benedetto et al., 2017; Meena et al., 2017; Bargaz et al., 2018). Sin embargo, es necesario ese aporte de nutrientes restante. Por este motivo, formular productos que contengan los nutrientes necesarios

en conjunto con los microorganismos nos permite obtener un producto que proporcione ambos aspectos y permita reducir la cantidad de fertilizantes químicos y la contaminación derivada del exceso de estos. A la misma vez, se ha demostrado la mejora en la fertilidad del suelo gracias a la combinación de fertilizantes minerales y orgánicos (Kumar et al., 2019).

En resumen, la selección de las sustancias portadoras adecuadas y la incorporación de los microorganismos, en formatos que aseguren la viabilidad de estos a largo plazo, es esencial para obtener un biofertilizante con una vida útil larga que permita su almacenaje y distribución asegurando su eficacia.

1.3. Ensayos agronómicos de los biofertilizantes

Una vez desarrolladas y validadas las formulaciones de los biofertilizantes que mejor aseguren la viabilidad de los microorganismos, se debe proceder a los estudios agronómicos mediante ensayos en cultivos. Los formulados deben demostrar su eficacia agronómica en los cultivos de interés, demostrando el efecto de los microorganismos, juntamente con las sustancias portadoras y posibles aditivos. En este sentido, se debe escoger el cultivo o cultivos objetivos del biofertilizante desarrollado. Por este motivo, como se puede ver en el Capítulo 3, se escogió la planta de tomate por su gran interés en horticultura y como cultivo modelo (Kimura & Sinha, 2008). Sin embargo, para el biofertilizante N7 con A. [REDACTED] se escogió el maíz, por ser un cultivo altamente demandante de nitrógeno. Por este motivo se espera que este biofertilizante sea mayoritariamente utilizado en maíz y otros cereales (Ranum et al., 2014).

Una vez escogidos los cultivos de interés se ensayan los biofertilizantes desarrollados y los fertilizantes utilizados como sustancia portadora. De esta manera, se puede observar el efecto de la incorporación de los microorganismos en los materiales portadores, en comparación con el efecto de los materiales portadores sin microorganismos. En este caso, en los resultados del Capítulo 3, se observa que cada biofertilizante desarrollado muestra unos efectos distintos. El biofertilizante P30 con B. [REDACTED] y el biofertilizante 6-4-4 con [REDACTED] muestran mejoras en el rendimiento del cultivo del tomate, en comparación con los fertilizantes sin microorganismos. Por otro lado, el fertilizante N7 con A. [REDACTED] permite aumentar

los nitratos en suelo durante el primer mes después de la aplicación, en comparación con el fertilizante N7, que mantiene similares los nitratos en suelo después de su aplicación. Por último, MO con [REDACTED] aumenta el rendimiento del cultivo y mejora la calidad del fruto, en comparación con las plantas control. Sin embargo, Superamino con [REDACTED] no muestra mejoras en ningún parámetro debidas a los microorganismos. Los efectos observados en plantas de tomate y maíz demuestran el efecto positivo de los formulados, es decir, de la unión de los inóculos con los fertilizantes. Este resultado indica que los microorganismos aumentan la eficiencia de los nutrientes aportados por los fertilizantes, coincidiendo con los resultados reportados por Khaliq et al., (2006), que observaron que la aplicación de microorganismos mejoraba la eficiencia de fertilizantes orgánicos e inorgánicos, mejorando el rendimiento de la semilla de algodón.

En resumen, es fundamental tener en cuenta el cultivo o cultivos de interés, donde se realizará el ensayo agronómico de los biofertilizantes. Además, se debe comparar el efecto de los biofertilizantes y los materiales portadores (fertilizantes) sin microorganismos, para comprobar el efecto de los microorganismos en los formulados desarrollados.

2. Tipos de biofertilizantes y efectividad en planta de tomates

En los últimos años se ha reportado la diversidad de microorganismos que poseen capacidades beneficiosas para las plantas, como microorganismos fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fósforo o productores de PGRs. En este sentido, diversos microorganismos han sido ensayados, demostrando su eficacia en la mejora de la producción y de la calidad de los frutos, entre otros parámetros de interés agronómico (Gravel et al., 2007; Mena-Violante & Olalde-Portugal, 2007; El-Yazeid & Abou-Aly, 2011; Gao et al., 2015). En los estudios llevados a cabo se escogió la planta de tomate para ensayar la eficacia de los microorganismos, ya que el tomate es un cultivo de interés mundial, con gran relevancia agronómica, económica y científica (De Pablo & Battistuzzi, 2012; FAO, 2020). Los resultados mostraron que la aplicación de los microorganismos y biofertilizantes desarrollados poseen efectos positivos en el cultivo del tomate. Sin embargo, los efectos observados fueron distintos dependiendo del

microorganismo y del formulado utilizado. De esta manera, el mayor aumento en el rendimiento del cultivo se observó al aplicar *B. [REDACTED]* en plantas con deficiencia de fósforo soluble (Capítulo 1). En este caso el aumento de la producción fue de un 52%. Además el peso fresco de los tomates se incrementó en un 55% y el peso seco en un 60%. No obstante, los TSS y la TA del fruto no se vieron afectados por la aplicación de esta bacteria, es decir, el aumento en la disponibilidad del fósforo gracias a *B. [REDACTED]* afectó positivamente al rendimiento del cultivo y no a la calidad de los frutos.

Por otro lado, teniendo en cuenta tanto los parámetros de rendimiento del cultivo como aquellos relacionados con la calidad del fruto, el biofertilizante que mostró un mayor efecto fue MO con [REDACTED] seguido de *A. [REDACTED]* en plantas con deficiencia de nitrógeno. La aplicación de MO con [REDACTED] resultó en un aumento de la producción de un 37% y un incremento del 29% y 36% del peso fresco y peso seco, respectivamente. Además la relación TSS/TA aumentó un 15%, en comparación con las plantas control (Capítulo 3). Sin embargo, en comparación con las plantas tratadas solo con MO, el peso fresco aumentó un 20% y el peso seco un 19%, mientras que la producción se incrementó un 20%. Por su lado, *A. [REDACTED]* en plantas de tomate con deficiencia de nitrógeno mostró un incremento de la producción de un 27% y un aumento del 24%, tanto del peso fresco como del peso seco. Al mismo tiempo, la relación TSS/TA amento un 15% (Capítulo 1). Estos dos tratamientos fueron los únicos que mostraron efectos positivos en la calidad del tomate. En el caso de MO con [REDACTED] se trata de una mezcla de diversos microorganismos, incorporados en materia orgánica. La aplicación de materia orgánica en suelos ha demostrado ser beneficiosa para la fertilidad de los suelos y mejora de los cultivos. Además, la materia orgánica potencia el crecimiento y activación de los microorganismos en el suelo (Araújo et al., 2009; Mohammadi et al., 2011). Por este motivo, al aplicar un biofertilizante que posee tanto materia orgánica como microorganismos beneficios, se consigue un mayor efecto en la planta, probablemente debida a una mayor activación de los microorganismos en el suelo. Además, este biofertilizante cuenta con una mezcla de tres microorganismos. Por un lado, *A. salinestris*, bacteria fijadora de nitrógeno y productora de PGRs. Por otro lado *B. [REDACTED]* bacteria con capacidad de solubilizar el fósforo, y por último *F. [REDACTED]* bacteria movilizadora de potasio (Pindi & Satyanarayana, 2012; Omer et al., 2016;

Wyciszkievicz et al., 2017). Esa mezcla de microorganismos proporciona un efecto conjunto a través de diversas habilidades, capaces de mejorar el crecimiento vegetal. De esta manera, al unir los tres microorganismos y la materia orgánica se logra obtener un biofertilizante capaz de mejorar significativamente, tanto el rendimiento del cultivo como la calidad del tomate.

Asimismo, A. [REDACTED] en plantas con deficiencia de nitrógeno, mostró el mayor incremento en la calidad del fruto y una mejora del rendimiento del cultivo similar a MO. En este caso, el efecto observado es debido a la capacidad de fijación de nitrógeno por A. [REDACTED] de manera que mejora la disponibilidad de nitrógeno para la planta (Noaret et al., 2018). Además, la mejora observada en este caso puede ser mayor debido al efecto de la baja disponibilidad de nutrientes en el microorganismo aplicado. Este efecto se describe más adelante (4. Microorganismos beneficiosos en agricultura: Relación entre efecto y disponibilidad de nutrientes en el medio).

Igualmente, otros biofertilizantes también mostraron mejoras en el peso fresco y peso seco del tomate y en la producción por planta. Tanto la bacteria *P.* [REDACTED] (Capítulo 1), como P30 con A. [REDACTED] y 6-4-4 con [REDACTED] (Capítulo 3) mostraron mejoras similares en los tres parámetros comentados, cuando se ensayaron en plantas de tomate sin deficiencias.

De esta manera, tanto los biofertilizantes fijadores de nitrógeno, como los solubilizadores de fósforo o aquellos formulados con una mezcla de microorganismos son efectivos en plantas de tomate. Sin embargo, MO con [REDACTED] fue el biofertilizante que mostró una mayor efectividad global, dado que mejoró significativamente todos los parámetros analizados. Por otro lado, en cuanto a la producción, el mayor efecto fue gracias a la aplicación de *B.* [REDACTED] en plantas con deficiencia de fósforo.

3. Biofertilizantes y reducción de fertilizantes químicos

El desarrollo y uso de biofertilizantes en agricultura ha aumentado en las últimas décadas debido a sus beneficios para los cultivos, la fertilidad del suelo y la

reducción de la contaminación provocada por el uso excesivo de fertilizantes. De esta manera, los microorganismos utilizados en biofertilizantes han demostrado ser capaces de reducir la dosis de fertilizantes químicos sin implicar ningún perjuicio en las plantas (Adesemoye et al., 2009; Molla et al., 2012; Sharma et al., 2021). En el presente estudio se observó esta ventaja en diversos de los tratamientos llevados a cabo. En este sentido, *A. [REDACTED]* como bacteria fijadora de nitrógeno, demostró mejorar el nitrógeno disponible y revertir los efectos de la deficiencia de nitrógeno en la planta. Por un lado, se observó en el Capítulo 1 que la aplicación de *A. [REDACTED]* en plantas de tomate con una deficiencia de nitrógeno del 20%, permitía mantener la calidad del tomate similar a las plantas sin deficiencia de nitrógeno, mientras que las plantas deficientes en nitrógeno reducían la calidad de los frutos. Además, en este caso, el rendimiento del cultivo fue mayor en plantas de tomate con reducción de nitrógeno y *A. [REDACTED]* que en plantas sin deficiencia de nitrógeno. De manera que *A. [REDACTED]* mostró ser útil para reducir la cantidad de nitrógeno aportado en más de un 20%, sin afectar a los parámetros de calidad y rendimiento del cultivo. Por otro lado, los resultados del Capítulo 3 muestran que la aplicación de N7 con *A. [REDACTED]* en el cultivo del maíz resultaba en un aumento de nitratos en suelo del 36%, mientras que la aplicación de N7 sin microorganismos no implicaba un aumento de nitratos en suelo. Estos resultados indican que la capacidad de fijar el nitrógeno de *A. [REDACTED]* permitiría una reducción de fertilizantes nitrogenados de aproximadamente 36%, sin implicar una reducción de nitrógeno disponible en suelo. Los resultados obtenidos de la aplicación de *A. [REDACTED]* son similares a los observados por Nosheen & Bano, (2014), que expusieron que la inoculación de *A. [REDACTED]* permitía la reducción de la dosis de fertilizantes nitrogenados en un 50% en cártamo. Además, Romero-Perdomo et al., (2017) también observaron la posible reducción de fertilizantes nitrogenados gracias a una especie de la familia *Azotobacter*. En este caso la aplicación de *A. chroococcum* en plantas de algodón permitió la reducción del 50% de la dosis de fertilizante nitrogenado. De esta manera, se observó que el biofertilizante N7 con *A. [REDACTED]* podría permitir una reducción de la cantidad de nitrógeno aportado a través de fertilizantes químicos en un 20-36%, sin implicar efectos negativos sobre el cultivo.

De la misma manera, *B. [REDACTED]* gracias a su capacidad de solubilizar el fósforo permitiría reducir la cantidad de fertilizantes fosfatados o cambiar las fuentes de fosfato aportadas a los cultivos. Así, por un lado se observa en el Capítulo 1 que la

aplicación de esta bacteria en plantas de tomate, con fósforo inorgánico insoluble como única fuente de fósforo, aumenta significativamente el rendimiento del cultivo y mantienen la calidad de los frutos. Es decir, *B. [REDACTED]* con una fuente de fosfato insoluble inorgánico, es capaz de mejorar el cultivo del tomate, de manera que podría indicar que esta bacteria es capaz de proporcionar suficiente fósforo soluble a la planta durante todo su ciclo, gracias a su capacidad de solubilizar fósforo (Yu et al., 2012; Wyciszkievicz et al., 2017). Además, los resultados del Capítulo 3 muestran que el biofertilizante P30 con *B. [REDACTED]* aumenta el rendimiento del cultivo, incluso cuando este se proporciona en la mitad de dosis que el fertilizante P30 sin microorganismos. Estos resultados indican que *B. [REDACTED]* permite reducir la cantidad de fertilizante fosfatado aplicado a la mitad o más sin perjudicar al cultivo. El potencial de *B. [REDACTED]* para solubilizar fuentes de fosfato insoluble como la roca fosfórica en cultivos, coincide con otros estudios. Han & Lee, (2005) observaron que esta bacteria era capaz de solubilizar esta fuente de fosfato y permitía así aumentar la disponibilidad de este nutriente, cuando se aplicaba en plantas de berenjena. De manera similar, Velineni & Brahma Prakash, (2011) observaron que la concentración de fósforo en la raíz y tallo aumentaba cuando se aplicaba fosfato de roca y *B. [REDACTED]* en plantas de caupí. Por este motivo, gracias a que este microorganismo es capaz de proporcionar fósforo disponible a través de fuentes insolubles, permite evitar la necesidad de aportar fuentes de fósforo solubles. Por el contrario, se pueden utilizar estas fuentes de fosfato, que de otra manera serían difícilmente asimilables por la planta y aprovechar el fósforo insoluble que generalmente se encuentra de forma natural en el suelo, ya que únicamente el 1% del fósforo de los suelos se encuentra en forma soluble (Bünemann, 2015). Es decir, *B. [REDACTED]* permite reducir la cantidad de fertilizantes fosfatados y permite utilizar únicamente una fuente insoluble de fosfato durante todo el ciclo de la planta del tomate sin perjudicar el cultivo.

Por último, el biofertilizante 6-4-4 con *[REDACTED]* también permite una reducción de fertilizantes químicos. Los resultados observados en el Capítulo 3 muestran que 6-4-4 con *[REDACTED]* mejora los parámetros de rendimiento del cultivo y mantiene la calidad del tomate. Estos resultados se mantienen cuando se aplica la mitad de dosis de biofertilizante 6-4-4 con *[REDACTED]* que la aplicada de fertilizante 6-4-4. En este sentido, la mezcla de los tres microorganismos aplicados y sus diferentes características proporciona una acción conjunta, que permite la

reducción de nitrógeno, fósforo y potasio sin implicar ningún efecto negativo en el cultivo. [REDACTED] está formado por *A. salinestris*, *B.* [REDACTED] y *F.* [REDACTED]. En este consorcio de microorganismos *A. salinestris* proporciona nitrógeno a través de la fijación de nitrógeno y PGRs, como son giberelinas, IAA, y ACC-deaminasa. Simultáneamente, *B.* [REDACTED] es capaz de solubilizar el fósforo y *F.* [REDACTED] moviliza el potasio (Pindi & Satyanarayana, 2012; Omer et al., 2016; Wyciszkievicz et al., 2017). De esta manera, el fertilizante 6-4-4 con [REDACTED] permitiría una reducción mayor al 50% sin implicar una reducción de rendimiento del cultivo ni calidad de los frutos.

4. Microorganismos beneficiosos en agricultura: Relación entre efecto y disponibilidad de nutrientes en el medio

Los microorganismos aplicados en agricultura son beneficiosos debido a su implicación en los ciclos biogeoquímicos y/o la producción de PGRs. En ambos casos, la planta se beneficia de estos efectos debido a la unión de estos microorganismos a las raíces de esta. La colonización de las raíces, ya sea superficialmente, penetrando en la raíz, o incluso formando nódulos, empieza con la exudación de sustancias quimiotácticas por parte de la planta, que atraen a los microorganismos. En este sentido, se forma una unión que beneficia a ambos organismos, mientras la planta mejora su disponibilidad de nutrientes y de sustancias promotoras del crecimiento, el microorganismo obtiene un nicho más seguro y se beneficia de los exudados de las raíces (Badri & Vivanco, 2008; Knights et al., 2021). Los exudados de las plantas modulan la abundancia y diversidad de microorganismos de la rizosfera, ya que dependiendo de las sustancias exudadas se atraerán y/o se inhibirán ciertos microorganismos (Haichar et al., 2008; Doornbos et al., 2011). Los exudados de las plantas pueden cambiar por diversos factores ambientales, por ejemplo el estrés abiótico provoca cambios significativos en las sustancias exudadas (Wittenmayer & Merbach, 2005). En este sentido, los resultados de los distintos ensayos llevados a cabo podrían indicar que la disponibilidad de nutrientes es un factor importante en la relación planta-microorganismos y/o en la activación de los microorganismos. En este sentido, *A.* [REDACTED] cuando se aplicó en plantas con una deficiencia de nitrógeno del

20%, mostró una mejora significativa de todos los parámetros analizados. El uso de esta bacteria aumentó un 24% tanto el peso fresco como el peso seco de los tomates, y un 27% la producción por planta. Además los TSS aumentaron un 7% y la TA se redujo un 7%, de manera que la relación TSS/TA aumentó un 15%. Estos resultados mostraron que en un suelo con deficiencia de nitrógeno, *A. [REDACTED]* mostró un efecto pronunciado en la planta. Por este motivo, y a través de su capacidad de fijar el nitrógeno, *A. [REDACTED]* fue capaz de suplir la deficiencia de nitrógeno de la planta. De esta manera, los parámetros de calidad de los frutos, que provenían de plantas con deficiencia de nitrógeno tratadas con esta bacteria, son similares a los de las plantas sin deficiencias. Además, el rendimiento del cultivo fue superior en las plantas tratadas con *A. [REDACTED]* en comparación con aquellas sin deficiencias de nutrientes.

Por otro lado, el uso de N7 con *A. [REDACTED]* en maíz, en un suelo con alto contenido de nitratos, mostró un aumento de nitratos en suelo, debido al efecto de esta bacteria como fijadora de nitrógeno atmosférico (Poole & Hill, 1997; Noar et al., 2018). Sin embargo, no se observó una mayor absorción de nitrógeno por la planta ni una mejora en la producción del cultivo debida al uso de *A. [REDACTED]*. Este efecto puede indicar que el microorganismo no colonizo las raíces de la planta de maíz, ya que sus efectos se observan en suelo pero no en planta. Estos diferentes efectos observados en los dos ensayos parecen indicar que en una situación de deficiencia de nitrógeno se promueve la unión del microorganismo a las raíces de la planta, y consecuentemente la planta muestra los efectos del microorganismo. Sin embargo, serían necesarios estudios complementarios sobre la unión de los microorganismos a las raíces de las plantas en situaciones de estrés por déficit de nutrientes, para profundizar en esta hipótesis.

Asimismo, los resultados obtenidos con la aplicación de *B. [REDACTED]* en plantas de tomate muestran similitudes con lo descrito en el caso de *A. [REDACTED]*. En este sentido, cuando *B. [REDACTED]* se aplicó en plantas de tomate, en las cuales se substituyó el fósforo disponible por fósforo insoluble, se observó una mejora significativa del rendimiento del cultivo. Los resultados mostraron un aumento del peso fresco del 55% y del peso seco del 60%, provocando un aumento de la producción por planta del 52%, en comparación con las plantas sin fósforo disponible y sin la adición de microorganismo. Además, el rendimiento del cultivo de las plantas sin disponibilidad de fósforo tratadas con *B. [REDACTED]* supero el observado en plantas

sin deficiencias de nutrientes. Por otro lado, *B.* [REDACTED] también se ensayó formulado con fertilizante P30 en plantas de tomate sin deficiencia de nutrientes. En este caso, la aplicación del formulado resultó en un incremento del peso fresco de los frutos del 20% y del peso seco de los frutos del 18,96%. Además, la producción aumentó en un 17%. La comparación de los resultados de ambos ensayos muestra un efecto mayor de *B.* [REDACTED] en una situación de baja disponibilidad de fósforo soluble. Esto podría indicar que la unión de *B.* [REDACTED] a las raíces y/o su actividad metabólica dependen de la concentración de fósforo soluble en el medio, siendo mayor en ausencia de fósforo disponible.

De esta manera, los distintos resultados descritos indican que el efecto de *A.* [REDACTED] y *B.* [REDACTED] en plantas de tomate se ven afectados por la disponibilidad de nutrientes en el medio. Los resultados coinciden con los reportados por Egamberdiyeva, (2007) que indicó que *Pseudomonas alcaligenes*, *Bacillus polymyxa* y *Mycobacterium phlei* tenían un mayor efecto estimulador del crecimiento en plantas de maíz en un suelo deficiente en nutrientes que en un suelo rico en nutrientes. Además, Wu et al., (2005) observó este efecto en micorrizas y *A. chroococcum*. Cuando estos microorganismos eran inoculados en plantas de maíz con un bajo nivel de fertilización se observaba una mayor micorrización y una mayor concentración de *A. chroococcum* en la rizosfera, en comparación con los tratamientos con un alto nivel de fertilización.

Estos efectos observados pueden estar relacionados con los exudados producidos por las plantas en situaciones de estrés abiótico. En este sentido, se ha observado que la deficiencia de nutrientes como el nitrógeno o el fósforo provoca cambios significativos en los exudados de las plantas. Estos cambios en los exudados afectan a los microorganismos de la rizosfera de diversas maneras (Bais et al., 2006; Carvalhais et al., 2010). Por un lado, ciertos exudados son capaces de atraer a los microorganismos de forma selectiva. Además, los exudados también implican una activación o inhibición de actividades metabólicas de los microorganismos (Liu et al., 2011; Carvalhais et al., 2013).

En resumen, la disponibilidad de nutrientes juega un papel en el efecto de los microorganismos sobre las plantas. Por este motivo, es necesario investigar el papel de los nutrientes en la colonización de las raíces por parte de los microorganismos y en su

actividad metabólica. Estas investigaciones pueden ser de gran utilidad en agricultura. En este sentido, el análisis de los suelos, previamente a la aplicación de biofertilizantes, sería esencial para obtener una alta efectividad por parte de los microorganismos en los cultivos. De esta manera, los biofertilizantes a aplicar y el momento de aplicación deberían depender del estado nutricional del suelo. Así, a través de esta práctica se evitaría una fertilización excesiva, que puede ser perjudicial tanto para el cultivo como para el medio ambiente, y se lograría maximizar la eficiencia de los nutrientes, que resultaría en mejoras en el rendimiento del cultivo y la calidad de los frutos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Los aspectos fundamentales del desarrollo de biofertilizantes son:
 - Seleccionar los microorganismos conforme a las necesidades de la agricultura, las características de los microorganismos y la eficacia de estos en el cultivo o cultivos de interés.
 - Seleccionar las sustancias portadoras y aditivos que aumenten la viabilidad de los microorganismos y por tanto la vida útil del biofertilizante. Además, seleccionar aquellas sustancias que impliquen una mejora en la activación o la eficiencia de los microorganismos en los cultivos.
 - Seleccionar el cultivo o cultivos de mayor interés para el ensayo de los biofertilizantes según los cultivos objetivo del producto y el interés agronómico del cultivo.
- En plantas de tomate, la aplicación de *B.* [REDACTED] permite utilizar únicamente una fuente de fósforo insoluble durante todo el ciclo de la planta, al mismo tiempo que mejora el rendimiento del cultivo.
- El biofertilizante líquido MO con [REDACTED] es eficaz en plantas de tomate, aumentando el rendimiento y la calidad de los frutos, gracias al efecto conjunto de la materia orgánica y *A. salinestrus*, *B.* [REDACTED] y *F.* [REDACTED]. Este biofertilizante proporciona la mejora más significativa en plantas de tomate, teniendo en cuenta el rendimiento del cultivo y la calidad de los frutos.
- Los biofertilizantes sólidos 6-4-4 con [REDACTED] y P30 con *B.* [REDACTED] son eficaces en plantas de tomate, en ambos casos mejorando el rendimiento del cultivo.
- Los biofertilizantes permiten reducir la dosis de fertilizantes químicos sin implicar efectos negativos ni en la producción ni en la calidad de los frutos:
 - N7 con *A.* [REDACTED] podría permitir una reducción del 20 al 36% de la dosis de fertilizante nitrogenado en plantas de tomate y maíz.
 - 6-4-4 con [REDACTED] permite la reducción de un 50% de la dosis de fertilizante NPK en plantas de tomate, mejorando simultáneamente el rendimiento del cultivo.

- P30 con *B.* [REDACTED] permite la reducción de un 50% de la dosis de fertilizantes fosfatados en plantas de tomate, mejorando simultáneamente el rendimiento del cultivo.
- La disponibilidad de nutrientes en el medio es un factor clave en la eficiencia de los microorganismos en agricultura:
 - En condiciones de deficiencia de nitrógeno *A.* [REDACTED] aumenta su eficiencia en plantas de tomate.
 - En condiciones de baja disponibilidad de fósforo soluble *B.* [REDACTED] incrementa su eficiencia en plantas de tomate.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abadias, M., Benabarre, A., Teixidó, N., Usall, J., & Viñas, I. (2001). Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*, *65*(3), 173–182. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00513-4](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00513-4)
- Abbamondi, G. R., Tommonaro, G., Weyens, N., Thijs, S., Sillen, W., Gkorezis, P., Iodice, C., de Melo Rangel, W., Nicolaus, B., & Vangronsveld, J. (2016). Plant growth-promoting effects of rhizospheric and endophytic bacteria associated with different tomato cultivars and new tomato hybrids. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, *3*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40538-015-0051-3>
- Adesemoye, A. O., & Kloepper, J. W. (2009). Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *85*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2196-0>
- Adesemoye, A. O., Torbert, H. A., & Kloepper, J. W. (2009). Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecology*, *58*(4), 921–929. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9531-y>
- Ahamd, M., Zeshan, M., Nasim, M., Zahir, Z.A., Nadeem, S.M., Nazli, F., & Jamil, M. (2015). Improving the productivity of cucumber through combined application of organic fertilizers and *Pseudomonas fluorescens*. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, *52*(4), 1011-1016.
- Arai, Y., & Livi, K. J. (2013). Underassessed phosphorus fixation mechanisms in soil sand fraction. *Geoderma*, *192*, 422–429. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.06.021>
- Araújo, A., Leite, L., Santos, V., & Carneiro, R. (2009). Soil microbial activity in conventional and organic agricultural systems. *Sustainability*, *1*(2), 268–276. <https://doi.org/10.3390/su1020268>
- Araújo, A., Santos, V., & Monteiro, R. (2008). Responses of soil microbial biomass and activity for practices of organic and conventional farming systems in PiauÍ state, Brazil. *European Journal of Soil Biology*, *44*(2), 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2007.06.001>
- Arif, M.S., Shahzad, S.M., Yasmeen, T., Riaz, M., Ashraf. M., Ashraf M. A., Mubarik M. S., & Kausar, R. (2017). Improving plant phosphorus (P) acquisition by

- phosphate-solubilizing bacteria. In Naeem, M., Ansari, A., Gill, S. (Eds.), *Essential plant nutrients* (pp. 513–556) Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58841-4_21
- Arkhipova, T. N., Prinsen, E., Veselov, S. U., Martinenko, E. V., Melentiev, A. I., & Kudoyarova, G. R. (2007). Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. *Plant and Soil*, *292*(1–2), 305–315. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9233-5>
 - Arkhipova, T. N., Veselov, S. U., Melentiev, A. I., Martynenko, E. V., & Kudoyarova, G. R. (2005). Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil*, *272*(1–2), 201–209. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-5047-x>
 - Asghar, H. N., Zahir, Z. A., Arshad, M., & Khaliq, A. (2002). Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology and Fertility of Soils*, *35*(4), 231–237. <https://doi.org/10.1007/s00374-002-0462-8>
 - Badri, D. V., & Vivanco, J. M. (2008). Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment*, 666–681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01926.x>
 - Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S. & Vivanco, J.M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, *57*(1), 233–266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>
 - Bargaz, A., Lyamlouli, K., Chtouki, M., Zeroual, Y., & Dhiba, D. (2018). Soil microbial resources for improving fertilizers efficiency in an integrated plant nutrient management system. *Frontiers in microbiology*, *9*, 1606. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01606>
 - Basak, B. B., & Biswas, D. R. (2009). Influence of potassium solubilizing microorganism (*Bacillus mucilaginosus*) and waste mica on potassium uptake dynamics by sudan grass (*Sorghum vulgare* Pers.) grown under two Alfisols. *Plant Soil*, *317*, 235–255. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9805-z>
 - Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, *16*(4), 729–770. [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(98\)00003-2](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(98)00003-2)

- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. P. (2013). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, 378(1–2), 1–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- Basosi, R., Spinelli, D., Fierro, A., & Jez, S. (2014). Mineral nitrogen fertilizers: Environmental impact of production and use. In: Lopez-Valdez, F., Luqueno, F.F, *Fertilizers: Components, uses in agriculture and environmental impacts* (pp. 3–43) NOVA Science Publishers: Hauppauge, NY, USA.
- Bastian, R., Weberling, R., & Palilla, F. (1957). Ultraviolet spectrophotometric determination of nitrate. Application to analysis of alkaline carbonates. *Analytical Chemistry*, 29(12), 1795–1797. <https://doi.org/10.1021/ac60132a038>
- Battacharyya, D., Babgohari, M. Z., Rathor, P., & Prithiviraj, B. (2015). Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.012>
- Bhardwaj, D., Ansari, M., Sahoo, R., & Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 66. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-66>
- Bhat, T. A., Ahmad, L., Ganai, M. A., Ul-Haq, S., & Khan, O. A. (2015). Nitrogen fixing biofertilizers; mechanism and growth promotion: A review. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 9(2), 1675-1690.
- Billah, M., Khan, M., Bano, A., Hassan, T. U., Munir, A., & Gurmani, A. R. (2019). Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture. *Geomicrobiology Journal*, 36(10), 904–916. <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1654043>
- Bleeker, A. B., & Kende, H. (2000). Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16(1), 1–18. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.1>
- Bona, E., Cantamessa, S., Massa, N., Manassero, P., Marsano, F., Copetta, A., Lingua, G., D'Agostino, G., Gamalero, E., & Berta, G. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting *Pseudomonas* improve yield, quality and nutritional value of tomato: A field study. *Mycorrhiza*, 27(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0727-y>

- Botta, A. L., Santacecilia, A., Ercole, C., Cacchio, P., & Del Gallo, M. (2013). *In vitro* and *in vivo* inoculation of four endophytic bacteria on *Lycopersicon esculentum*. *New Biotechnology*, 30(6), 666–674. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.01.001>
- Bremner, J. (1960). Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method. *The Journal of Agricultural Science*, 55(1), 11–33. <https://doi.org/10.1017/S0021859600021572>
- Bünemann, E. K. (2015). Assessment of gross and net mineralization rates of soil organic phosphorus – A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 89, 82–98. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.06.026>
- Caballero-Mellado, J., Martínez-Aguilar, L., Paredes-Valdez, G., & Santos, P. E. D. L. (2004). *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1165–1172. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02951-0>
- Caballero-Mellado, J., Onofre-Lemus, J., Estrada-de los Santos, P., & Martínez-Aguilar, L. (2007). The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5308–5319. <https://doi.org/10.1128/aem.00324-07>
- Cameron, K., Di, H., & Moir, J. (2013). Nitrogen losses from the soil/plant system: A review. *Annals of Applied Biology*, 162(2), 145–173. <https://doi.org/10.1111/aab.12014>
- Carvalhais, L. C., Dennis, P. G., Fan, B., Fedoseyenko, D., Kierul, K., Becker, A., von Wieren, N., & Borriss, R. (2013). Linking plant nutritional status to plant-microbe Interactions. *PLoS ONE*, 8(7), e68555. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068555>
- Carvalhais, L. C., Dennis, P. G., Fedoseyenko, D., Hajirezaei, M. R., Borriss, R., & von Wirén, N. (2010). Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174(1), 3–11. <https://doi.org/10.1002/jpln.201000085>
- Chauhan, A., Guleria, S., Walia, A., Mahajan, R., Verma, S. & Shirkot, C.K. (2014). Isolation and characterization of *Bacillus* sp. with their effect on growth of tomato seedlings. *Indian Journal of Agricultural Biochemistry*, 27(2), 193–201.

- Chung, S., Lim, H. M., & Kim, S. D. (2007). Formulation of stable *Bacillus subtilis* AH18 against temperature fluctuation with highly heat-resistant endospores and micropore inorganic carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(1), 217–224. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0992-y>
- Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>
- Dasgan, H. Y., Aydoner, G., & Akyol, M. (2012). Use of some microorganisms as bio-fertilizers in soilless grown squash for saving chemical nutrients. *Acta Horticulturae*, 927, 155–162. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2012.927.17>
- De Pablo, J. & Battistuzzi, M.A.G. (2012). Analytical model for the global consumption of tomatoes - The Spanish case. *African Journal of Agricultural Research*, 7(15), 1228–1235.
- Di Benedetto, N. A., Corbo, M. R., Campaniello, D., Cataldi, M. P., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., & Flagella, Z. (2017). The role of plant growth promoting bacteria in improving nitrogen use efficiency for sustainable crop production: A focus on wheat. *AIMS microbiology*, 3(3), 413–434. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.413>
- Dodds, W. K., & Whiles, M. R. (2010). Nitrogen, sulfur, phosphorus, and other nutrients. *Freshwater Ecology*, 345–373. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374724-2.00014-3>
- Doornbos, R. F., van Loon, L. C., & Bakker, P. A. H. M. (2011). Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(1), 227–243. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0028-y>
- Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Dudás, A., Szalai, Z. M., Vidéki, E., Wass-Matics, H., Kocsis, T., Végvári, G. Y., Kotroczó, Z.S., & Biró, B. (2017). Sporeforming *Bacillus* bioeffectors for healthier fruit quality of tomato in pots and field. *Applied Ecology and Environmental Research*, 15(4), 1399–1418. http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1504_13991418

- Dursun, A., Ekinci, M. & Dönmez, M.F. (2010). Effects of foliar application of plant growth promoting bacterium on chemical contents, yield and growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 42(5), 3349-3356.
- Egamberdiyeva, D. (2007). The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology*, 36(2–3), 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.02.005>
- El-Kholy, M.A., El-Ashry, S. & Gomaa, M.A. (2005). Biofertilization of maize crop and its impact on yield and grains nutrient content under low rates of mineral fertilizers. *Journal of Applied Sciences Research*, 1(2), 117-121.
- El-Yazeid, A., & Abou-Aly, H. (2011). Enhancing growth, productivity and quality of tomato plants using phosphate solubilizing microorganisms. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(7): 371-379.
- Esitken, A., Yildiz, H. E., Ercisli, S., FigenDonmez, M., Turan, M., & Gunes, A. (2010). Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Scientia Horticulturae*, 124(1), 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.12.012>
- Esquivel-Cote, R., Ramírez-Gama, R. M., Tsuzuki-Reyes, G., Orozco-Segovia, A., & Huante, P. (2010). *Azospirillum lipoferum* strain AZm5 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency. *Plant and Soil*, 337(1–2), 65–75. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0499-7>
- FAO. (2020). FAOSTAT, Food Supply. Accessed March 2021. <http://faostat.fao.org/site/345/default.aspx>
- Fließbach, A., & Mäder, P. (2000). Microbial biomass and size-density fractions differ between soils of organic and conventional agricultural systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(6), 757–768. [https://doi.org/10.1016/s0038-0717\(99\)00197-2](https://doi.org/10.1016/s0038-0717(99)00197-2)
- Franche, C., Lindström, K., & Elmerich, C. (2008). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321(1–2), 35–59. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9833-8>
- Galloway, J. N., Leach, A. M., Bleeker, A., & Erisman, J. W. (2013). A chronology of human understanding of the nitrogen cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1621), 20130120. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0120>

- Gao, M., Zhou, J.J., Wang, E.T., Chen, Q., Xu, J., & Sun, J.G., (2015). Multiphasic characterization of a plant growth promoting bacterial strain *Burkholderia* sp. 7016 and its effect on tomato growth in the field. *Journal of Integrative Agriculture*, *14*(9), 1855–1863. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60932-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60932-1)
- García-Fraile, P., Carro, L., Robledo, M., Ramírez-Bahena, M. H., Flores-Félix, J. D., Fernández, M. T., Mateos, P. F., Rivas, R., Igual, J. M., Martínez-Molina, E., Peix, L., & Velázquez, E. (2012). Rhizobium promotes non-legumes growth and quality in several production steps: Towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *PLoS ONE*, *7*(5), e38122. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038122>
- García-Seco, D., Bonilla, A., Algar, E., García-Villaraco, A., Mañero, J. G., & Ramos-Solano, B. (2012). Enhanced blackberry production using *Pseudomonas fluorescens* as elicitor. *Agronomy for Sustainable Development*, *33*(2), 385–392. <https://doi.org/10.1007/s13593-012-0103-z>
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, *169*(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>
- Glick, B. R., Penrose, D. M., & Li, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, *190*(1), 63–68. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1997.0532>
- Glick, B. R., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., & McConkey, B. (2007). Promotion of plant growth by bacterial ACC-deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *26*(5–6), 227–242. <https://doi.org/10.1080/07352680701572966>
- Global Footprint Network. (2019). Sustainable development. Human development index and ecological footprint (2016). Accessed March 2021. http://data.footprintnetwork.org/?_ga=2.245264077.972494000.1580173981-105897319.1575079121#/sustainableDevelopment?cn=all&type=earth&yr=2016
- Gong, H., Li, J., Sun, M., Xu, X., & Ouyang, Z. (2020). Lowering carbon footprint of wheat-maize cropping system in North China Plain: Through microbial fertilizer application with adaptive tillage. *Journal of Cleaner Production*, *268*, 122255. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122255>
- Gowariker, V., Krishnamurthy, V. N., Gowariker, S., Dhanorkar, M., & Paranjape, K. (2008). *The fertilizer encyclopedia*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9780470431771>

- Gravel, V., Antoun, H., & Tweddell, R. J. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8), 1968–1977. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.02.015>
- Groffman, P. M. (2012). Terrestrial denitrification: Challenges and opportunities. *Ecological Processes*, 1(11). <https://doi.org/10.1186/2192-1709-1-11>
- Gutiérrez-Mañero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., R. Tadeo, F., & Talon, M. (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*, 111(2), 206–211. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x>
- Gyaneshwar, P., Naresh Kumar, G., Parekh, L. J., & Poole, P. S. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, 245(1), 83–93. <https://doi.org/10.1023/a:1020663916259>
- Haichar, F. E. Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J. I., Prosser, J. I., Balesdent, J., Heulin, T., & Achouak, W. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal*, 2(12), 1221–1230. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.80>
- Han, H.S., & Lee, K. (2005). Phosphate and potassium solubilizing bacteria effect on mineral uptake, soil availability and growth of eggplant. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1(2), 176-180.
- Hasani, H., & Aminpanah, H. (2015). Effect of *Pseudomonas fluorescens* inoculation on yield and yield components of rice (*Oryza sativa* L.) under different levels of phosphorus fertilizer. *Thai Journal of Agricultural Science*, 48(3), 157-163.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579–598. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>
- Hayatsu, M., Tago, K., & Saito, M. (2008). Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54(1), 33–45. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00195.x>
- He, Y., Wu, Z., Tu, L., Han, Y., Zhang, G., & Li, C. (2015). Encapsulation and characterization of slow-release microbial fertilizer from the composites of

- bentonite and alginate. *Applied Clay Science*, 109-110, 68–75.
<https://doi.org/10.1016/j.clay.2015.02.001>
- Hernández, V., Hellín, P., Fenoll, J., & Flores, P. (2020). Impact of nitrogen supply limitation on tomato fruit composition. *Scientia Horticulturae*, 264, 109173.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109173>
 - Herridge, D.F., & Peoples, M.B. (2008). Boddey, R.M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil*, 311, 1–18.
<https://doi.org/10.1007/s11104-008-9668-3>
 - Herrmann, L., & Lesueur, D. (2013). Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(20), 8859–8873. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5228-8>
 - Hoagland, D.R. & Arnon, D.I. (1938). The water-culture method for growing plants without soil. *University of California, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station*, 34, 1–39.
 - Hu, X., Roberts, D. P., Xie, L., Maul, J. E., Yu, C., Li, Y., Zhang, S., & Liao, X. (2013). Development of a biologically based fertilizer, incorporating *Bacillus megaterium* A6, for improved phosphorus nutrition of oilseed rape. *Canadian Journal of Microbiology*, 59(4), 231–236. <https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0579>
 - Hubálek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46(3), 205–229. [https://doi.org/10.1016/s0011-2240\(03\)00046-4](https://doi.org/10.1016/s0011-2240(03)00046-4)
 - Iqbal, N., Khan, N. A., Ferrante, A., Trivellini, A., Francini, A., & Khan, M. I. R. (2017). Ethylene role in plant growth, development and senescence: Interaction with other phytohormones. *Frontiers in Plant Science*, 08, 205–229.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00475>
 - Itelima, J. U., Bang, W. J., Onyimba, I. A., & Egbere O. J. (2018). A review: Biofertilizer - A key player in enhancing soil fertility and crop productivity. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2(1), 22–28.
 - Jaiswal D. K., Verma J. P., Prakash S., Meena V. S. & Meena R. S. (2016). Potassium as an important plant nutrient in sustainable agriculture: A state of the art. In Meena V., Maurya B., Verma J. & Meena R. (eds) *Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture* (pp. 21-29). Springer, New Delhi.
https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2_2

- Janzen, R., Rood, S., Dormaar, J., & McGill, W. (1992). *Azospirillum brasilense* produces gibberellin in pure culture on chemically-defined medium and in co-culture on straw. *Soil Biology and Biochemistry*, 24(10), 1061–1064. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90036-w](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90036-w)
- Jiménez, M. R., Casanova, L., Saavedra, T., Gama, F., Suárez, M. P., Correia, P. J., & Pestana, M. (2019). Responses of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants to iron deficiency in the root zone. *Folia Horticulturae*, 31(1), 223–234. <https://doi.org/10.2478/fhort-2019-0017>
- Ju, X., Kou, C., Christie, P., Dou, Z., & Zhang, F. (2007). Changes in the soil environment from excessive application of fertilizers and manures to two contrasting intensive cropping systems on the North China Plain. *Environmental Pollution*, 145(2), 497–506. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.04.017>
- Karadeniz, A., Topcuoğlu, F., & İnan, S. (2006). Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(10), 1061–1064. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-4561-1>
- Karthika, K.S., Rashmi, I., & Parvathi, M.S. (2018). Biological functions, uptake and transport of essential nutrients in relation to plant growth. In Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Oku, H., Nahar, K., Hawrylak-Nowak, B. (eds) *Plant nutrients and abiotic stress tolerance* (pp. 1-49) Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-9044-8_1
- Khalid, A., Tahir, S., Arshad, M., & Zahir, Z. A. (2004). Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere and non-rhizosphere soils. *Soil Research*, 42(8), 921. <https://doi.org/10.1071/sr04019>
- Khaliq, A., Abbasi, M.K., & Hussain, T. (2006). Effects of integrated use of organic and inorganic nutrient sources with effective microorganisms (EM) on seed cotton yield in Pakistan. *Bioresource Technology*, 97(8), 967–972. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.05.002>
- Khan, A. L., Waqas, M., Kang, S. M., Al-Harrasi, A., Hussain, J., Al-Rawahi, A., Al-Khiziri, S., Ullah, I., Ali, L., Jung, H. Y., & Lee, I. J. (2014). Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. *Journal of Microbiology*, 52(8), 689–695. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4002-7>

- Kimura, S., & Sinha, N. (2008). Tomato (*Solanum lycopersicum*): A model fruit-bearing crop. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2008(12), pdb.emo105. <https://doi.org/10.1101/pdb.emo105>
- Kishore, N. (2015). Phosphate-solubilizing microorganisms: A critical review. In P. K. Pindi & S. R. Reddy (Eds.), *Plant Biology and Biotechnology* (pp. 307–333). Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6_12
- Knights, H. E., Jorin, B., Haskett, T. L., & Poole, P. S. (2021). Deciphering bacterial mechanisms of root colonization. *Environmental Microbiology Reports*, 666–681. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12934>
- Kochar, M., Upadhyay, A., & Srivastava, S. (2011). Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression. *Research in Microbiology*, 162(4), 426–435. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.03.006>
- König, S., Vogel, H. J., Harms, H., & Worrlich, A. (2020). Physical, chemical and biological effects on soil bacterial dynamics in microscale models. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, 53. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00053>
- Kramer, A. W., Doane, T. A., Horwath, W. R., & Kessel, C. V. (2002). Combining fertilizer and organic inputs to synchronize N supply in alternative cropping systems in California. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 91(1–3), 233–243. [https://doi.org/10.1016/s0167-8809\(01\)00226-2](https://doi.org/10.1016/s0167-8809(01)00226-2)
- Kumar B. M., Labanya, R., & Joshi, H. C. (2019). Influence of long-term chemical fertilizers and organic manures on soil fertility - A review. *Universal Journal of Agricultural Research*, 7(5), 177–188. <https://doi.org/10.13189/ujar.2019.070502>
- Kumar, P., Kaushal, N., & Dubey, R. C. (2015). Isolation and identification of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (*Pseudomonas* spp.) and their effect on growth promotion of *Lycopersicon esculentum* L. *Academia Arena*, 7(5), 44- 51.
- Kuypers, M. M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 263–276. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>
- Latimer, N. (2016). *Official Methods of Analysis of AOAC international, 20th Edition, 2016*, Rockville, MD, USA.
- Lee, K. H., Koh, R. H., & Song, H. G. (2008). Enhancement of growth and yield of tomato by *Rhodopseudomonas* sp. under greenhouse conditions. *The Journal of Microbiology*, 46(6), 641–646. <https://doi.org/10.1007/s12275-008-0159-2>

- Lee, S. K., Lur, H. S., Lo, K. J., Cheng, K. C., Chuang, C. C., Tang, S. J., Yang, Z. W., & Liu, C. T. (2016). Evaluation of the effects of different liquid inoculant formulations on the survival and plant-growth-promoting efficiency of *Rhodopseudomonas palustris* strain PS3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(18), 7977–7987. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7582-9>
- Lehnert, N., Dong, H. T., Harland, J. B., Hunt, A. P., & White, C. J. (2018). Reversing nitrogen fixation. *Nature Reviews Chemistry*, *2*(10), 278–289. <https://doi.org/10.1038/s41570-018-0041-7>
- Liu, J., Tang, L., Gao, H., Zhang, M., & Guo, C. (2018). Enhancement of alfalfa yield and quality by plant growth-promoting rhizobacteria under saline-alkali conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(1), 281–289. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9185>
- Liu, J., Wang, G., Jin, J., Liu, J., & Liu, X. (2011). Effects of different concentrations of phosphorus on microbial communities in soybean rhizosphere grown in two types of soils. *Annals of Microbiology*, *61*(3), 525–534. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0168-3>
- Lucas, R. E., & Davis, J. F. (1961). Relationships between ph values of organic soils and availabilities of 12 plant nutrients. *Soil Science*, *92*(3), 177–182. <https://doi.org/10.1097/00010694-196109000-00005>
- Lucy, M., Reed, E., & R. Glick, B. (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, *86*(1), 1–25. <https://doi.org/10.1023/b:anto.0000024903.10757.6e>
- Maathuis, F. J. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology*, *12*(3), 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.04.003>
- MacMillan, J. (2001). Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, *20*(4), 387–442. <https://doi.org/10.1007/s003440010038>
- Malhotra H., Vandana, Sharma S. & Pandey R. (2018). Phosphorus nutrition: Plant growth in response to deficiency and excess. In Hasanuzzaman M., Fujita M., Oku H., Nahar K. & Hawrylak-Nowak B. (eds). *Plant nutrients and abiotic stress tolerance* (pp. 171-190). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-9044-8_7
- Malusà, E., Pinzari, F., & Canfora, L. (2016). Efficacy of biofertilizers: Challenges to improve crop production. In Singh, D.P. *Microbial inoculants in sustainable*

- agricultural productivity* (pp. 17–40) Springer, New Delhi
https://doi.org/10.1007/978-81-322-2644-4_2
- Malusá, E., Sas-Paszt, L., & Ciesielska, J. (2012). Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–12. <https://doi.org/10.1100/2012/491206>
 - Manikandan, R., Saravanakumar, D., Rajendran, L., Raguchander, T., & Samiyappan, R. (2010). Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for its efficacy against *Fusarium* wilt of tomato. *Biological Control*, 54(2), 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.04.004>
 - Manwar, A. V., Khandelwal, S. R., Chaudhari, B. L., Meyer, J. M., & Chincholkar, S. B. (2004). Siderophore production by a marine *Pseudomonas aeruginosa* and its antagonistic action against phytopathogenic fungi. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118(1–3), 243–252. <https://doi.org/10.1385/abab:118:1–3:243>
 - Mayak, S., Tirosh, T., & Glick, B. R. (2004a). Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(6), 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.05.009>
 - Mayak, S., Tirosh, T., & Glick, B. R. (2004b). Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science*, 166(2), 525–530. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.10.025>
 - McGrath, J., Spargo, J., & Penn, C. (2014). Soil fertility and plant nutrition. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 166–184. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-52512-3.00249-7>
 - McNeill, A., & Unkovich, M. (2007). The nitrogen cycle in terrestrial ecosystems. In Marschner, P., Rengel, Z. (Eds). *Nutrient cycling in terrestrial ecosystems* (pp. 37-64) Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-68027-7_2
 - Meeks, J. C., & Elhai, J. (2002). Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(1), 94–121. <https://doi.org/10.1128/membr.66.1.94-121.2002>
 - Meena, V. S., Maurya, B., & Verma, J. P. (2014). Does a rhizospheric microorganism enhance K⁺ availability in agricultural soils? *Microbiological Research*, 169(5–6), 337–347. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.003>
 - Meena, V. S., Meena, S. K., Verma, J. P., Kumar, A., Aeron, A., Mishra, P. K., Bisht, J. K., Pattanayak, A., Naveed, M., & Dotaniya, M. (2017). Plant beneficial rhizospheric

- microorganism (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency: A review. *Ecological Engineering*, *107*, 8–32. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.06.058>
- Mehta, P., Walia, A., Kulshrestha, S., Chauhan, A., & Shirkot, C. K. (2014). Efficiency of plant growth-promoting P-solubilizing *Bacillus circulans* CB7 for enhancement of tomato growth under net house conditions. *Journal of Basic Microbiology*, *55*(1), 33–44. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300562>
 - Mena-Violante, H. G., & Olalde-Portugal, V. (2007). Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticulturae*, *113*(1), 103–106. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.01.031>
 - Mishra, V. K., Ali, S., Gupta, R. K., & Shoket, H. (2015). TCP solubilization by growth promotory endophytic *Acinetobacter calcoaceticus* TM8 from tomato. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, *9*(2), 164-174.
 - Mohammadi, K., Heidari, G., Kholesro, S., & Sohrabi, Y. (2011). Soil management, microorganisms and organic matter interactions: A review. *African Journal of Biotechnology*, *10*(86), 19840–19849. <https://doi.org/10.5897/ajbx11.006>
 - Molla, A. H., ManjurulHaque, M., AmdadulHaque, M., & Ilias, G. N. M. (2012). *Trichoderma*-enriched biofertilizer enhances production and nutritional quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and minimizes NPK fertilizer use. *Agricultural Research*, *1*(3), 265–272. <https://doi.org/10.1007/s40003-012-0025-7>
 - Morgan, C., Herman, N., White, P., & Vesey, G. (2006). Preservation of microorganisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods*, *66*(2), 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>
 - Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *64*(3), 548–572. <https://doi.org/10.1128/membr.64.3.548-572.2000>
 - Noar, J. D., & Bruno-Bárcena, J. M. (2018). *Azotobacter vinelandii*: The source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology*, *164*(4), 421–436. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000643>

- Norman, R. J., & Stucki, J. W. (1981). The determination of nitrate and nitrite in soil extracts by ultraviolet spectrophotometry. *Soil Science Society of America Journal*, 45(2), 347–353. <https://doi.org/10.2136/sssaj1981.03615995004500020024>
- Nosheen, A., & Bano, A. (2014). Potential of plant growth promoting rhizobacteria and chemical fertilizers on soil enzymes and plant growth. *Pakistan Journal of Botany*, 46(4), 1521-1530.
- Nosrati, R., Owlia, P., Saderi, H., Rasooli, I., & Ali Malboobi, M. (2014). Phosphate solubilization characteristics of efficient nitrogen fixing soil *Azotobacter* strains. *Iranian journal of microbiology*, 6(4), 285–295.
- Ohyama, T. (2010). Nitrogen as a major essential element of plants. In K. Sueyoshi (Ed.), *Nitrogen assimilation in plants* (pp. 1–17). Research Signpost.
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 197. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>
- Oldroyd, G. E., Murray, J. D., Poole, P. S., & Downie, J. A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45(1), 119–144. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>
- Omer, A. M. (2010). Bioformulations of *Bacillus* Spores for using as Biofertilizer. *Life Science Journal*, 7(4), 124-131.
- Omer, A. M., Emara, H. M., Zaghloul, R. A., & Abdel-Monem, M. O. (2016). Potential of *Azotobacter salinestris* as plant growth promoting rhizobacteria under saline stress conditions. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 7(6), 2572-2583.
- Onofre-Lemus, J., Hernández-Lucas, I., Girard, L., & Caballero-Mellado, J. (2009). ACC (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in *Burkholderia* species, and its growth-promoting effect on tomato plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(20), 6581–6590. <https://doi.org/10.1128/aem.01240-09>
- Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M., & Sahin, F. (2006). Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Scientia Horticulturae*, 111(1), 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.09.002>

- Pandya, N. D., & Desai, P. V. (2014). Screening and characterization of GA₃ producing *Pseudomonas monteilii* and its impact on plant growth promotion. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(5), 110–115.
- Parija, S. C. (2012). *Textbook of microbiology & immunology*. Elsevier Gezondheidszorg.
- Parisi, M., Giordano, L., Pentangelo, A., D’Onofrio, B., & Villari, G. (2006) Effects of different levels of nitrogen fertilization on yield and fruit quality in processing Tomato. *Acta Horticulturae*, 700, 129–132. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2006.700.19>
- Park, K. H., Lee, C. Y., & Son, H. J. (2009). Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. *Letters in Applied Microbiology*, 49(2), 222–228. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2009.02642.x>
- Parke N., Schneegurt M., Thi Tu A. Forster B. M. & Lister P. (2017). *Microbiology*. OpenStax, Rice University.
- Pastor, N., Masciarelli, O., Fischer, S., Luna, V., & Rovera, M. (2016). Potential of *Pseudomonas putida* PCI2 for the protection of tomato plants against fungal pathogens. *Current Microbiology*, 73(3), 346–353. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1068-y>
- Patzel, N., Sticher, H., & Karlen, D. L. (2000). Soil fertility — Phenomenon and concept. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163(2), 129–142.
- Peng, Y., & Zhu, G. (2006). Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(1), 15–26. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0534-z>
- Pera, A., Vallini, G., Sireno, I., Lorella-Bianchin, M., & de Bertoldi, M. (1983). Effect of organic matter on rhizosphere microorganisms and root development of *Sorghum* plants in two different soils. *Plant and Soil*, 74(1), 3–18. <https://doi.org/10.1007/bf02178735>
- Pindi, P. K., & Satyanarayana S.D.V. (2012). Liquid microbial consortium- A potential tool for sustainable soil health. *Journal of Biofertilizers and Biopesticides*, 3(4), 1. <https://doi.org/10.4172/2155-6202.1000124>
- Poole, R. K., & Hill, S. (1997). Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*—Roles of the terminal oxidases. *Bioscience Reports*, 17(3), 303–317. <https://doi.org/10.1023/a:1027336712748>

- Prakash, O., Nimonkar, Y., & Shouche, Y. S. (2013). Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiology Letters*, 339(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12034>
- Radzki, W., Gutierrez Mañero, F. J., Algar, E., Lucas García, J. A., García-Villaraco, A., & Ramos Solano, B. (2013). Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104(3), 321–330. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9954-9>
- Raja Sekar, K., & Karmegam, N. (2010). Earthworm casts as an alternate carrier material for biofertilizers: Assessment of endurance and viability of *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium* and *Rhizobium leguminosarum*. *Scientia Horticulturae*, 124(2), 286–289. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.01.002>
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M. N. V., & Freitas, H. (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology*, 28(3), 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.002>
- Ramasamy, M., Geetha, T., & Yuvaraj, M. (2020). Role of biofertilizers in plant growth and soil health. In Rigobelo, E., Serra, A. *Nitrogen fixation* (pp. 1-11). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.87429>
- Ranum, P., Peña-Rosas, J. P., & Garcia-Casal, M. N. (2014). Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1312(1), 105–112. <https://doi.org/10.1111/nyas.12396>
- Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes. *Boletín Oficial del Estado*. España, 10 de julio de 2013, núm. 164, pp. 51119-51207.
- Reddy G .C., Goyal R. K., Puranik S., Waghmar V., Vikram K. V., & Sruthy K.S. (2020). Biofertilizers toward sustainable agricultural development. In Varma A., Tripathi S., Prasad R. (Eds). *Plant microbe symbiosis* (pp. 115-128) Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-36248-5_7
- REGLAMENTO (CE) 834/2007 del Consejo, de 28 de junio de 2007, sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CEE) nº 2092/91. *Boletín Oficial del Estado*. España, 20 de julio de 2007, núm. 189, pp. 1-23.
- Robertson, G. P., & Swinton, S. M. (2005). Reconciling agricultural productivity and environmental integrity: a grand challenge for agriculture. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 3(1), 38-46.

- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4–5), 319–339. [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(99)00014-2)
- Romero-Perdomo, F., Abril, J., Camelo, M., Moreno-Galván, A., Pastrana, I., Rojas-Tapias, D., & Bonilla, R. (2017). *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*): Effect in reducing N fertilization. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(4), 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.006>
- Ruttenger, K. (2003). The global phosphorus cycle. *Treatise on Geochemistry*, 585–643. <https://doi.org/10.1016/b0-08-043751-6/08153-6>
- Sadoff, H. L. (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological Reviews*, 39(4), 516–539.
- Saeid, A., Prochownik, E., & Dobrowolska-Iwanek, J. (2018). Phosphorus solubilization by *Bacillus* species. *Molecules*, 23(11), 2897. <https://doi.org/10.3390/molecules23112897>
- Sahu, P. K., & Brahma Prakash, G. P. (2016). Formulations of biofertilizers – Approaches and advances. In Singh, D., Singh, H., Prabha, R. (Eds). *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity* (pp. 179-198) Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2644-4_12
- Sainju, U.M., Dris, R. & Singh, B. (2003). Mineral nutrition of tomato. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 7(6), 176–183.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- Saravanakumar, D., & Samiyappan, R. (2007). ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *Journal of Applied Microbiology*, 102(5), 1283–1292. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03179.x>
- Saravanan, V. S., Subramoniam, S. R., & Raj, S. A. (2004). Assessing *in vitro* solubilization potential of different zinc solubilizing bacterial (ZSB) isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(1–2), 121–125. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822004000100020>
- Saravanan, V., Madhaiyan, M., & Thangaraju, M. (2007). Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium

- Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere*, 66(9), 1794–1798.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.07.067>
- Satyanarayana, V., Vara Prasad, P. V., Murthy, V. R., & Boote, K. J. (2002). Influence of Integrated use of farmyard manure and inorganic fertilizer on yield and yield components of irrigated lowland rice. *Journal of Plant Nutrition*, 25(10), 2081–2090.
<https://doi.org/10.1081/pln-120014062>
 - Savci, S. (2012). An agricultural pollutant: Chemical fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development*, 73–80.
<https://doi.org/10.7763/ijesd.2012.v3.191>
 - Sayyed R.Z., Chincholkar S.B., Reddy M.S., Gangurde N.S., & Patel P.R. (2013). Siderophore producing PGPR for crop nutrition and phytopathogen suppression. In Maheshwari, D. (Eds). *Bacteria in agrobiolgy: Disease management* (pp. 449-471). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-33639-3_17
 - Schachtman, D. P., Reid, R. J., & Ayling, S. (1998). Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. *Plant Physiology*, 116(2), 447–453.
<https://doi.org/10.1104/pp.116.2.447>
 - Setlow, P. & Kornberg, A. (1970). Biochemical studies of bacterial sporulation and germination. XXII. Energy metabolism in early stages of germination of *Bacillus megaterium* spores. *Journal of Biological Chemistry*, 245(14), 3637-3644.
 - Setlow, P. (2007). I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends in Microbiology*, 15(4), 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.02.004>
 - Sevilla, M., Burris, R. H., Gunapala, N., & Kennedy, C. (2001). Comparison of benefit to sugarcane plant growth and 15N₂ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif⁻ mutant strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(3), 358–366.
<https://doi.org/10.1094/mpmi.2001.14.3.358>
 - Shahzad, R., Waqas, M., Khan, A. L., Asaf, S., Khan, M. A., Kang, S. M., Yun, B. W., & Lee, I. J. (2016). Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 106, 236–243.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.006>
 - Shaikh, S. S., & Sayyed, R. Z. (2015). Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their formulation in biocontrol of plant diseases. In Arora, N. K. (Eds.). *Plant*

- microbes symbiosis: Applied facets* (pp. 337-351). Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2068-8_18
- Sharma, A., Shankhdhar, D., & Shankhdhar, S. C. (2016). Potassium-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and their role in potassium solubilization and uptake. In Meena, V., Maurya, B., Verma, J., Meena, R. (Eds). *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture* (pp. 203-219). Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2_15
 - Sharma, R., Shrivastav, V. L., & Sharma, S. (2021). Effect of substitution of chemical fertilizer by bioinoculants on plant performance and rhizospheric bacterial community: Case study with *Cajanus cajan*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(1), 373–386. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00418-7>
 - Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(1), 587. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>
 - Shen, J., Yuan, L., Zhang, J., Li, H., Bai, Z., Chen, X., Zhang, W., & Zhang, F. (2011). Phosphorus dynamics: From soil to plant. *Plant Physiology*, 156(3), 997–1005. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175232>
 - Sheng, X. F., & He, L. Y. (2006). Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(1), 66–72. <https://doi.org/10.1139/w05-117>
 - Shrivastav, P., Prasad, M., Singh, T. B., Yadav, A., Goyal, D., Ali, A., Dantu, P. K. (2020). Role of nutrients in plant growth and development. In Naeem, M., Ansari, A., Gill, S. (Eds). *Contaminants in agriculture* (pp. 43-59). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41552-5_2
 - Singh R.P. (2012). *Organic fertilizers: Types, production and environmental impact*. Nova Science Publishers, New York.
 - Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(4), a001438. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001438>
 - Stamenković, S., Bešković, V., Karabegović, I., Lazić, M., & Nikolić, N. (2018). Microbial fertilizers: A comprehensive review of current findings and future perspectives. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 16(1), e09R01. <https://doi.org/10.5424/sjar/2018161-12117>

- Steenhoudt, O., & Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: Genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 487–506. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.x>
- Stephan, D., Da Silva, A. P. M., & Bisutti, I. L. (2016). Optimization of a freeze-drying process for the biocontrol agent *Pseudomonas* spp. and its influence on viability, storability and efficacy. *Biological Control*, 94, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.12.004>
- Strable, J., & Scanlon, M. J. (2009). Maize (*Zea mays*): A model organism for basic and applied research in plant biology. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(10), pdb.emo132. <https://doi.org/10.1101/pdb.emo132>
- Sturz, A. V., Christie, B. R., & Nowak, J. (2000). Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19(1), 1–30. <https://doi.org/10.1080/07352680091139169>
- Sudhakar, P., Chattopadhyay, G., Gangwar, S., & Ghosh, J.K., (2000). Effect of foliar application of *Azotobacter*, *Azospirillum* and *Beijerinckia* on leaf yield and quality of mulberry (*Morus alba*). *The Journal of Agricultural Science*, 134(2), 227-234. doi:10.1017/S0021859699007376
- Sundara, B., Natarajan, V., & Hari, K. (2002). Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Research*, 77(1), 43–49. [https://doi.org/10.1016/s0378-4290\(02\)00048-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4290(02)00048-5)
- Suzuki, S., He, Y., & Oyaizu, H. (2003). Indole-3-Acetic acid production in *Pseudomonas fluorescens* HP72 and its association with suppression of creeping bentgrass brown patch. *Current Microbiology*, 47(2), 138–143. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3968-2>
- Tanimoto, E. (2005). Regulation of root growth by plant Hormones—Roles for auxin and gibberellin. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(4), 249–265. <https://doi.org/10.1080/07352680500196108>
- Teale, W. D., Paponov, I. A., & Palme, K. (2006). Auxin in action: Signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11), 847–859. <https://doi.org/10.1038/nrm2020>

- TechSci (2020). Biofertilizers market size and analysis, global industry. Accessed March 2021. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/biofertilizers-industry>
- Thomas, L., & Singh, I. (2019). Microbial biofertilizers: Types and applications. *Biofertilizers for Sustainable Agriculture and Environment*, 1–19. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18933-4_1
- Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A., & Aronsson, A. C. (2017). Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 8, 49. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00049>
- Trapet, P., Avoscan, L., Klinguer, A., Pateyron, S., Citerne, S., Chervin, C., Mazurier, S., Lemanceau, P., Wendehenne, D., & Besson-Bard, A. (2016). The *Pseudomonas fluorescens* siderophore pyoverdine weakens *Arabidopsis thaliana* defense in favor of growth in iron-deficient conditions. *Plant Physiology*, 171(1), 675–693. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01537>
- Tripathi, D. K., Singh, S., Singh, S., Mishra, S., Chauhan, D. K., & Dubey, N. K. (2015). Micronutrients and their diverse role in agricultural crops: Advances and future prospective. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(7), 139. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1870-3>
- Tsonev, T., & Lidon, F. J. C. (2012). Zinc in plants—An overview. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24(4), 322-333.
- United Nations (UN). (2019). 2019 Revision of world population prospects. Accessed March 2021. <https://esa.un.org/unpd/wpp>.
- United Nations General Assembly. (2015, October). *Transforming our world: The 2030 Agenda for Sustainable Development (A/RES/70/1)*. Accessed April 2021 <https://www.refworld.org/docid/57b6e3e44.html>
- Vaid, S., Kumar, B., Sharma, A., Shukla, A., & Srivastava, P. (2014). Effect of Zn solubilizing bacteria on growth promotion and Zn nutrition of rice. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14(4), 889-910. <https://doi.org/10.4067/s0718-95162014005000071>
- Van Oosten, M. J., Di Stasio, E., Cirillo, V., Silletti, S., Ventorino, V., Pepe, O., Raimondi, G., & Maggio, A. (2018). Root inoculation with *Azotobacter chroococcum* 76A enhances tomato plants adaptation to salt stress under low N conditions. *BMC Plant Biology*, 18(1), 205. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1411-5>

- Van Rhijn, P., & Vanderleyden, J. (1995). The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiological Reviews*, 59(1), 124-142.
- Vassilev, N., Malusa, E., Requena, A. R., Martos, V., López, A., Maksimovic, I., & Vassileva, M. (2017). Potential application of glycerol in the production of plant beneficial microorganisms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44(4-5), 735-743. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1810-2>
- Vassilev, N., Vassileva, M., Martos, V., Garcia del Moral, L. F., Kowalska, J., Tylkowski, B., & Malusá, E. (2020). Formulation of microbial inoculants by encapsulation in natural polysaccharides: Focus on beneficial properties of carrier additives and derivatives. *Frontiers in Plant Science*, 11, 270. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00270>
- Velineni, S., & Brahma Prakash, G.P. (2011). Survival and phosphate solubilizing ability of *Bacillus megaterium* in liquid inoculants under high temperature and desiccation stress. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13(5), 795-802.
- Verma, B. C., Pramanik, P., & Bhaduri, D. (2020). Organic fertilizers for sustainable soil and environmental management. In Meena, R. (Eds). *Nutrient dynamics for sustainable crop production* (pp. 289-313). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8660-2_10
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255(2), 571-586. <https://doi.org/10.1023/a:1026037216893>
- Viscardi, S., Ventrino, V., Duran, P., Maggio, A., De Pascale, S., Mora, M., & Pepe, O. (2016). Assessment of plant growth promoting activities and abiotic stress tolerance of *Azotobacter chroococcum* strains for a potential use in sustainable agriculture. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 16(3), 848-863. <https://doi.org/10.4067/s0718-95162016005000060>
- Walia, A., Mehta, P., Chauhan, A., & Shirkot, C. K. (2013). Effect of *Bacillus subtilis* strain CKT1 as inoculum on growth of tomato seedlings under net house conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 84(1), 145-155. <https://doi.org/10.1007/s40011-013-0189-3>
- Wang, D., Deng, X., Wang, B., Zhang, N., Zhu, C., Jiao, Z., Li, R., & Shen, Q. (2019). Effects of foliar application of amino acid liquid fertilizers, with or without *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9, on cowpea yield and leaf microbiota. *PLOS ONE*, 14(9), e0222048. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222048>

- Wei, Z., Du, T., Li, X., Fang, L., & Liu, F. (2018). Interactive effects of elevated CO₂ and N fertilization on yield and quality of tomato grown under reduced irrigation regimes. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 328. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00328>
- Weselowski, B., Nathoo, N., Eastman, A. W., MacDonald, J., & Yuan, Z. C. (2016). Isolation, identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* CR1 with potentials for biopesticide, biofertilization, biomass degradation and biofuel production. *BMC Microbiology*, *16*(1), 244. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0860-y>
- Wittenmayer, L., & Merbach, W. (2005). Plant responses to drought and phosphorus deficiency: Contribution of phytohormones in root-related processes. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *168*(4), 531–540. <https://doi.org/10.1002/jpln.200520507>
- Wu, S., Cao, Z., Li, Z., Cheung, K., & Wong, M. (2005). Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: A greenhouse trial. *Geoderma*, *125*(1–2), 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.07.003>
- Wyciszkievicz, M., Saeid, A., & Chojnacka, K. (2017). *In situ* solubilization of phosphorus-bearing raw materials by *Bacillus megaterium*. *Engineering in Life Sciences*, *17*(7), 749–758. <https://doi.org/10.1002/elsc.201600191>
- Wyss, O., Neumann, M. G., & Socolofsky, M. D. (1961). Development and germination of the *Azotobacter* cyst. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, *10*(4), 555–565. <https://doi.org/10.1083/jcb.10.4.555>
- Xu, M., Sheng, J., Chen, L., Men, Y., Gan, L., Guo, S., & Shen, L. (2013). Bacterial community compositions of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds and plant growth promoting activity of ACC deaminase producing *Bacillus subtilis* (HYT-12-1) on tomato seedlings. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*(3), 835–845. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1486-y>
- Yazdani, M., Bahmanyar, M., Pirdashti, H. & Ali Esmaili, M. (2009). Effect of phosphate solubilization microorganisms (PSM) and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components of corn (*Zea mays* L.). *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering*, *3*(1), 50 - 52.
- Yu, X., Liu, X., Zhu, T. H., Liu, G. H., & Mao, C. (2012). Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their

- effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. *European Journal of Soil Biology*, 50, 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2012.01.004>
- Zhang, X., Ward, B. B., & Sigman, D. M. (2020). Global nitrogen cycle: Critical enzymes, organisms, and processes for nitrogen budgets and dynamics. *Chemical Reviews*, 120(12), 5308–5351. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00613>
 - Zhu, Q., Ozores-Hampton, M., Li, Y., Morgan, K., Liu, G., & Mylavarapu, R. S. (2017). Effect of phosphorus rates on growth, yield, and postharvest quality of tomato in a calcareous soil, *HortScience*, 52(10), 1406-1412. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI12192-17>

Anexo 1

Nanofertilizer use for sustainable agriculture: Advantages and limitations



Review article

Nanofertilizer use for sustainable agriculture: Advantages and limitations

Faisal Zulfiqar^a, Míriam Navarro^{b,c}, Muhammad Ashraf^d, Nudrat Aisha Akram^e,
Sergi Munné-Bosch^{b,f,*}^a Institute of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Agriculture, Faisalabad, 38000, Pakistan^b Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain^c Productos Agrícolas Macasa, Igualada, Spain^d University of Agriculture Faisalabad, 38000, Pakistan^e Department of Botany, Government College University Faisalabad, Pakistan^f Institute of Nutrition and Food Safety, University of Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords: Abiotic stress
Environment
Fertilizers
Nanotechnology
Nanomaterials
Nanofertilizers
Plant nutrition

ABSTRACT

Nutrient fertilization plays a critical role in maintaining soil fertility and improving crop productivity and quality. Precise nutrient management of horticultural crops is a major challenge worldwide as it relies predominantly on chemical fertilizers. Traditional fertilizers are not only costly for the producer, but may be harmful to humans and the environment. This has led to the search for environmentally friendly fertilizers, particularly those with high nutrient-use efficiency, and nanotechnology is emerging as a promising alternative. Nanofertilizers offer benefits in nutrition management through their strong potential to increase nutrient use efficiency. Nutrients, either applied alone or in combination, are bound to nano-dimensional adsorbents, which release nutrients very slowly as compared to conventional fertilizers. This approach not only increases nutrient-use efficiency, but also minimizes nutrient leaching into ground water. Furthermore, nanofertilizers may also be used for enhancing abiotic stress tolerance and used in combination with microorganisms (the so-called nano-biofertilizers) provide great additional benefits. However, although the benefits of nanofertilizers are undoubtedly opening new approaches towards sustainable agriculture, their limitations should also be carefully considered before market implementation. In particular, the extensive release of nanomaterials into the environment and the food chain may pose a risk to human health. In conclusion, although nanofertilizers use in agriculture is offering great opportunities to improve plant nutrition and stress tolerance to achieve higher yields in a frame of climate change, not all nanomaterials will be equally safe for all applications. The risks of nanofertilizers should be carefully examined before use, and further biotechnological advances are required for a correct and safe application of nanomaterials in agriculture.

1. Introduction

Agriculture, including horticultural crops, is a major economic sector related to the production and provision of a wide range of specialty crops for food, feed, and ornamental purposes and it currently represents a worldwide multitrillion dollar industry [1]. Limited resources and the rapidly-increasing human population, which is predicted to reach 9.6 billion by 2050, pushes the sector forward demanding the development of a very efficient agriculture while allowing reduction of worldwide poverty and hunger [2]. Chemical fertilizers provide plants with nutrients for optimal growth and productivity; however, current production practices cannot fulfill the growing demand of food without reliance on the extensive use of fertilizers [2].

Given the limited amount of additional arable lands and scarce water resources globally, the use of more efficient mineral fertilizers is a necessary approach to fulfill the increase in food production required to feed this increasing population and support economic development. Furthermore, intensive application of conventional fertilizers over extended periods of time has caused serious environmental constraints worldwide including ground water pollution, water eutrophication, soil quality degradation, and air pollution [3].

Limited nutrient use efficiency and environmental constraints associated with the use of chemical fertilizers remain a major problem and a hindrance for achieving reasonable sustainability in agriculture. Additionally, cost increases resulting from over-application of chemical fertilizers reduce profit margins for growers. Low nutrient use

* Corresponding author at: Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain.
E-mail address: smunne@ub.edu (S. Munné-Bosch).

<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110270>

Received 1 July 2019; Received in revised form 23 August 2019; Accepted 12 September 2019

Available online 16 September 2019 0168-9452/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

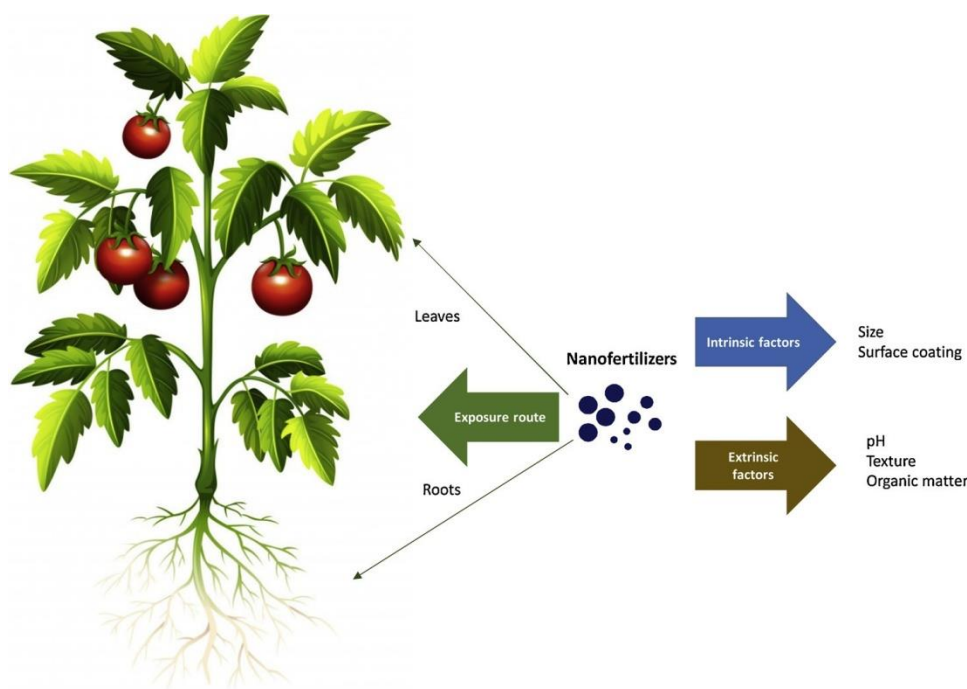


Fig. 1. Factors that influence uptake, distribution and accumulation of nanofertilizers in crops. Intrinsic factors (nanofertilizers), extrinsic factors (soil) and exposure route.

efficiencies are typically the result of high release rates of conventional fertilizers overwhelming the actual nutrient absorption rate by plants, and/or the transformation of fertilizers/nutrients to forms that are not bioavailable to crops [4]. As such, there is a great interest towards the development of new innovative fertilizer sources in order to increase the fertilizer use efficiency [5]. Several strategies have been proposed to increase fertilizer use efficiency, such as the use of precision fertilization, split or localized application, fertigation, and the use of nanofertilizers [6]. In the context of sustainable agriculture, application of nanotechnology for the development of new types of fertilizers is regarded as one of the potentially promising options for significantly boosting global horticultural production to meet the growing food demands of population with the added benefits of sustainability under the current scenario of climate change [7,8]. A correct application of nanofertilizers can feed plants gradually in a controlled manner [9] along with the benefits of increasing the fertilizer use efficiency, minimizing volatilization and leaching, and lessening environmental hazards [10]. Several studies, which will be discussed here, have revealed that some nanofertilizers have the potential to increase crop productivity by enhancing seed germination, seedling growth, photosynthesis, nitrogen metabolism, and protein and carbohydrate synthesis, aside from improving stress tolerance. Among other advantages, nanofertilizers can be applied in a comparatively smaller amount, ultimately reducing the transport expenditures and increasing ease of application. However, nanofertilizers may also have some disadvantages, which can limit their full implementation in the market.

2. Advantages of nanofertilizers

There is a growing pressure on the agriculture sector to fulfill the continuously increasing demands of the consistently growing human population. Chemical fertilizers are thought to be indispensable for improving crop productivity and are extensively applied through different methods [8]. However, crop usage is generally less than half of the applied amount of fertilizer [11], and the remaining amount of minerals intended to reach the targeted site may leach down, so that

they become fixed in soil or contribute to water pollution [12]. For instance, it has been reported that key macronutrient elements, including N, P, and K, applied to the soil are lost by 40–70%, 80–90% and 50–90%, respectively, causing a considerable loss of resources [8,10,11]. Furthermore, growers tend to use repeated applications of these fertilizers in order to achieve desired higher yields, which contrarily can lead to a decrease in soil fertility and increase salt concentrations thereby causing future crop losses. Furthermore, uneven use of fertilization without control on nutrient release can deteriorate product quality. Hence, it is crucial to develop slow/control release fertilizers not only to increase crop production and quality, but also to enhance the sustainability in horticultural production [8].

The horticulture sector today is facing an intense pressure for achieving considerable efficiency in food security using alternatives to chemical fertilizers [12]. New approaches and technologies are required if global horticultural production and demand are to be fulfilled in an economically and environmentally sustainable manner. Materials that are of up to 100 nm particle size in at least one dimension are generally classified as nanomaterials [13,14] and are the basis for nanotechnology [15]. There are various types of nanomaterials such as single or multiwalled nanotubes, magnetized iron nanoparticles, copper (Cu), aluminum (Al), silver (Ag), gold (Au), zinc (Zn) and zinc oxide (ZnO), silica (Si), cerium oxide (Ce_2O_3), and titanium dioxide (TiO_2), among others [16–19]. Given the unique properties of nanomaterials such as high surface-to-volume ratio, controlled-release kinetics to targeted sites and sorption capacity, nanotechnology has a high relevance for the design and use of new fertilizers [8]. Nanofertilizers are nutrients encapsulated/coated with nanomaterial for the control and slow delivery of one or more nutrients in order to satisfy the imperative nutrient requirements of plants [20]. These “smart fertilizers” are currently being regarded as a promising alternative [21], to the extreme that they are in several cases considered to be the preferred form of fertilizers over the conventional ones [22,23].

The interaction of nanomaterials and fertilizers, due to the high reactivity of nanomaterials, results in an increased and effective absorption of nutritional elements and essential compounds for plants [24]. The efficiency of nanofertilizers depends on several factors (Fig. 1). Uptake, distribution and accumulation of nanofertilizers in

crops will strongly depend on both intrinsic and extrinsic factors, and the exposure route. Particle size and surface coatings are the most important intrinsic factors influencing the efficiency of nanoparticles application, and extrinsic factors, such as organic matter, soil texture or soil pH will also strongly affect its potential application [25,26]. In addition, nanofertilizers can be absorbed through both plant roots or leaves, so that the exposure route and mode of application significantly influence the behavior, bioavailability, and uptake of nanofertilizers in crops [25].

Nanofertilizer applications in agriculture may serve as an opportunity to achieve sustainability towards global food production. There is a tremendous food production pressure on the sector as nutritional deficiencies in human populations are mainly because of using less nutritious food and a low dietary intake of fruits and vegetables [27]. Important benefits of nanofertilizers over conventional chemical fertilizers rely on their nutrient delivery system [12]. They regulate the availability of nutrients in crops through slow/control release mechanisms. Such a slow delivery of nutrients is associated with the covering or cementing of nutrients with nanomaterials [10]. By taking advantage of this slow nutrient delivery, growers can increase their crop growth because of consistently long-term delivery of nutrients to plants. For example, nutrients can be released over 40–50 days in a slow release fashion rather than the 4–10 days by the conventional fertilizers [11]. In conventional nutrient management systems, half of the applied fertilizer is lost in leaching or becomes unavailable for the plant because of excessive availability hindering the roots to uptake or sometimes causing toxic effects on the plant. Furthermore, nanofertilizers reduce the need for transportation and application costs [28]. Another advantage of using small quantities is that the soil does not get loaded with salts that usually are prone to over-application using conventional fertilizers on a short- or long-term basis [29]. Another advantage for using nanofertilizers is that they can be synthesized according to the nutrient requirements of intended crops [30]. In this regard, biosensors can be attached to a new innovative fertilizer that controls the delivery of the nutrients according to soil nutrient status, growth period of a crop or environmental conditions [29]. Plants are sensitive towards micronutrient availability during crop growth and negative effects result in the form of fruits and vegetables with poor nutrition [31,32]. In conventional nutrient management system, it is very difficult to control the micronutrient delivery to a specific crop, but nanofertilizers provide the opportunity to the growers for supplying adequate amounts of nutrients [8,33]. For instance, most of the horticultural growing areas worldwide are deficient in certain micronutrients (e.g. Zn and Fe [31]), so nanofertilizers can act as effective and efficient fortification products for crop and fresh food products. Nanofertilizers increase the bioavailability of nutrients through their high specific surface area, miniature size and high reactivity [12]. On the other hand, by providing balanced nutrition, nanofertilizers enable the plant to combat various biotic and abiotic stresses, with overall clear advantages. However, the extensive use of nanofertilizers in agriculture may have some important limitations, which must also be considered and will be discussed later in detail.

3. Production and use of nanofertilizers

Nanomaterials or nanoparticles for nanofertilizers can be synthesized by different approaches, top-down, bottom-up or using biological approaches (Fig. 2). The top-down approach is based on the reduction of size to nanoscale well-organized assemblies from the bulk materials. Top-down is a physical method based on milling materials. The limitation in this approach is the low control in the size of nanoparticles and a greater quantity of impurities. The bottom-up approach begins at the atomic or molecular scale to build up nanoparticles using chemical reactions. It is a chemically controlled synthetic process, therefore, this method controls the particle size better and reduces impurities [34,35].

In addition to chemical and physical approaches, nanoparticles can be synthesized biologically, the so-called biosynthesis approach. There are several natural sources for this purpose, some of them are plants, fungi and bacteria based. The advantage in this approach is the greater control of the toxicity and size of the particle [25,36]. For every application the most recommended approach will require a synthesis capable of producing mass scale particles with controlled physico-chemical properties resulting in a homogeneous and target-specific nanoformulation. Consequently, bottom-up is in most cases the most effective approach used nowadays for nanofertilizer production [7,34]. Scientists are under enormous pressure to deliver unique technologies that not only fulfill the grower's production demands, but also meet the economic budget of both the growers and production industry [1]. Nanoscience may provide the solution to cater these challenges by providing nanomaterials of high performance [23,37]. As discussed earlier, these innovative fertilizers aim to control the nutrient active ingredient release at a very slow pace in accordance or commensurate with crop growth. The main aim of using these nanofertilizers is to increase the nutrient use efficiency thereby leading to precision agriculture. In this context, nanofertilizer smart technology is expected to lead to a step forward to make the agriculture sector sustainable [38,39]. These fertilizers can be an excellent replacement for the conventional fertilizers that are required in bulk quantities, and additionally can save the soil and water from nutrient pollution [23]. The use of different nanofertilizers including N, P, K, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn and carbon nanotubes have shown an excellent control release for a targeted delivery efficiency [10,12]. Various forms of nanoparticles, their oxides nanoparticles, and nanoformulations of conventional nutrients have been converted into valuable inputs in nanofertilizer form. Conversion of these nanoparticles have depicted promising results when applied at a specific concentration on different crops [40].

Nanoparticles are made from organic and inorganic nanomaterials. Additionally, their synthesis also varies in terms of physical or chemical methods employed. The inorganic nanomaterials include the metal oxides such as ZnO, TiO₂, MgO and AgO, and others. On the other hand, the organic nanomaterials include lipids, polymers and carbon nanotubes. Nanoparticles of different materials are of usually four types, i.e. silver, gold, alloy and magnetic [(like Fe₃O₄ (magnetite) and Fe₂O₃ (maghemite)]. In this regard, the nanofertilizers are classified on the basis of the nutrient categorization. Hence, there are classically two types of nanofertilizers, i.e., micronutrient nanofertilizers and macronutrient nanofertilizers. Furthermore, nanobiofertilizers are also emerging as an additional approach [12,8].

Macronutrient nanofertilizers

Macronutrients (e.g., nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K), magnesium (Mg), sulphur (S) and calcium (Ca)) have been combined with nanomaterials for the purpose to deliver an accurate amount of nutrients to the crops and minimize their bulk requirements with extra-benefits of decreasing purchasing and transportation costs [4,41]. These macronutrient nanofertilizers comprise one or more nutrients in encapsulated form with specific nanomaterial. NPK consumption in the agriculture sector is projected to increase 265 million tons in 2020 [42]. As such, there is an urgent need to carry out research from a practical point of view to develop new fertilizers with high nutrient efficiency and being friendly to the environment to replace the conventional macronutrient fertilizers. As a nitrogen source, urea-modified zeolites, hydroxyapatite and mesoporous silica nanomaterials have been investigated as slow/control release nanofertilizers showing promising results [12,15]. Biosafe nanofertilizer was developed as a source of P that is a nanostructured water-phosphorite suspension (particle size of 60–120 nm). It was the first phosphatic nanofertilizer acquired from raw phosphorite of Tatarstan's Syundyukovskoe deposits through ultrasonic material dispersion. In this experiment, it was observed that the morphometric indices, fresh yield and fruit yield as well as production quality of tested plant species increased several-fold [43].

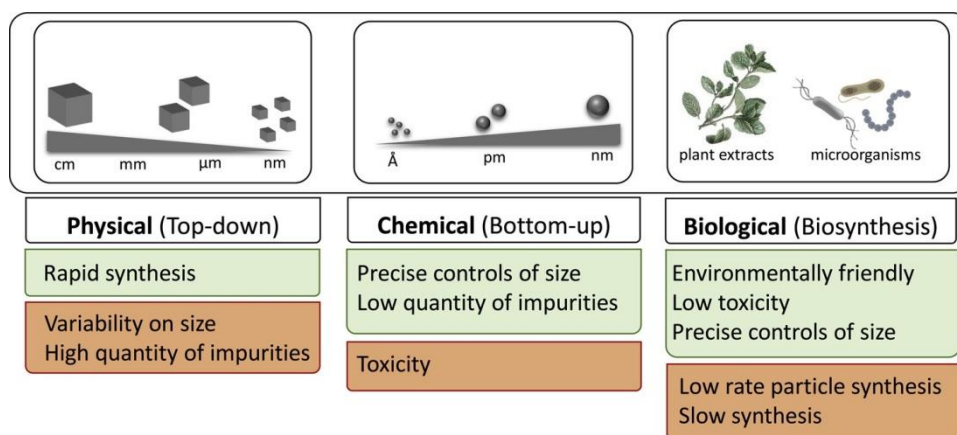


Fig. 2. Methods for the synthesis of nanofertilizers. Physical (top-down), chemical (bottom-up) and biological approached for the production of nanofertilizers.

Micronutrient nanofertilizers

Micronutrients are those elements that are required by the plant in trace/low quantities, but are essential to maintain vital metabolic processes in plants [44]. Plant growth is highly dependent on zinc (Zn) because it is a structural part or regulatory co-factor for various enzymes and proteins [45]. This micronutrient is also involved in the synthesis of carbohydrates, protein metabolism, and the regulation of auxins, and provides defense to plants against harmful pathogens [46]. On the other hand, boron (B) is not only involved in the biosynthesis of plant cell wall and its lignification, but also plays an important role in plant growth and various other physiological processes [47]. Hence, it is imperative to apply the proper amounts of Zn and B to horticultural crops for attaining maximum yields with good quality. The effect of foliar application of two micronutrient nanofertilizers of Zn and B at three different concentrations was tested and it was observed that low amounts of B (34 mg tree⁻¹) or Zn nanofertilizers (636 mg tree⁻¹) increased fruit yield by 30% in pomegranate trees (*Punica granatum* cv. Ardestani) [38]. It was also reported that cucumber seedlings grown in nutrient solution including rubber type nanomaterial as a Zn source increased shoot and fruit yield compared with those grown in commercial Zn-sulfate fertilizer [48]. Likewise, application of Zn nanoparticles as nanofertilizer in pearl millet (*Pennisetum americanum*) significantly enhanced crop production (grain yield) by 38%, which was also associated with an improvement of 15% in shoot length, 4% in root length, 24% in root area, 24% in chlorophyll content, 39% in total soluble leaf protein and 12% in plant dry biomass compared to the control in a period of 6 weeks [49]. Also, it was observed a considerable yield increase using Zn nanoparticles as a nutrient source in rice, maize, wheat, potato, sugarcane and sunflower [15]. Moreover, stabilized maghemite nanoparticles applied through irrigation in solution form in soil as a nanofertilizer improved the growth rate and chlorophyll contents compared to the control (chelated iron) in *Brassica napus* [50].

Iron (Fe) is also an important nutrient required by plants in minute quantities for maintaining proper growth and development. Although it is required in trace amounts, its deficiency or excess leads to impairment in key plant metabolic and physiological processes, thereby leading to reduced yield [51]. Therefore, application of Fe is imperative to optimize yields in horticultural crops. In this respect, the effect of iron oxide nanoparticles and ferric ions was studied at different concentrations on the physiological and molecular changes in *Citrus maxima* plants. It was observed that iron oxide nanoparticles entered the plant roots, but their translocation from root to shoot did not occur. Among the different levels used, 20 mg/L iron oxide nanoparticles had no impact on plant growth, while 50 mg/L significantly improved the chlorophyll contents and root activity by 23% and 24%, respectively, compared to controls. In contrast, 100 mg/L negatively influenced all these characteristics, thus indicating

that the effect of iron oxide nanoparticles is concentration dependent [52].

Manganese (Mn) plays a vital role not only in metabolic and physiological processes but it also provides the plant with the ability to endure various environmental stresses by acting as a co-factor of various enzymes. It is also essential for photosynthesis, the biosynthesis of ATP, chlorophyll, fatty acids and proteins, as well as secondary metabolites such as lignin and flavonoids [51]. The effects of laboratory-prepared Cu, Zn, Mn, and Fe oxide nanoparticles was assessed in low concentrations (< 50 mg/L) as micronutrients, on the germination of lettuce (*Lactuca sativa*) seeds. The results showed that CuO nanoparticles were slightly more toxic than Cu ions, while the toxicity of ZnO nanoparticles was similar to that of Zn ions. However, MnO nanoparticles and FeO nanoparticles were not only less toxic than their ionic counterparts but they also stimulated the growth of lettuce seedlings from 12% to 54% [6]. Other micronutrient nanofertilizers have also been tested in a number of crops (see Table 1 for additional examples).

Nanobiofertilizers

Biofertilizers are formulations or preparations containing one or more microorganisms enhancing soil productivity, by fixing atmospheric nitrogen, solubilizing phosphorus or stimulating plant growth through synthesis of growth-promoting substances [70–72]. Therefore, nanobiofertilizers could be defined as the integration of biofertilizers with nanostructures or nanoparticles in order to improve the growth of plants [73]. To achieve this goal is essential to control the delivery of biofertilizers in the soil and extend the useful life of formulations (Fig. 3).

Some of the most important aspects in nanobiofertilizers development are the interaction between nanoparticles and microorganisms, the shelf life of biofertilizers and its delivery. The interaction between gold nanoparticles and plant growth promoting rhizobacteria was shown to exert positive effects [74,75]. By contrast, silver nanoparticles cannot be used with biofertilizer because it causes adverse effects on biological processes in microorganisms, like alteration of cell membrane structure and functions [76]. On the other hand, the shelf life of biofertilizers is a limiting factor in these formulations and the use of nanomaterials can improve it. Use of nanoformulations can be helpful to enhance the stability of biofertilizers with respect to desiccation, heat, and UV inactivation. For example, polymeric nanoparticle coatings can be used to develop formulations resistant to desiccation and consequentially improve the useful life of these products [73,77]. Moreover, nanomaterials can be used to improve the delivery of biofertilizers to soil and plants. Trials using hydrophobic silica nanoparticles to the water-in-oil emulsion have shown an improvement in

Table 1
Impact of different micronutrient nanofertilizers on various crops under non-stressful conditions. Abbreviations: ROS, reactive oxygen species.

Type	Conc.	Crop	Effect	Ref.
Fe	50, 500 and 2000 mg/L	Cucumber	Dose-dependent effects on biomass and antioxidant enzymes	[49]
Fe	10, 20 mg/L	Lettuce	Reduced growth and chlorophyll contents, and increased antioxidant enzyme activities	[53]
Fe	30-60 ppm	Garden pea	Improved seed mass and chlorophyll content	[54]
Cu	0, 100, 500 mg/L	Squash	Higher ionic Cu found in media amended with bulk Cu than with nCu	[55]
Cu	130, 660 mg/Kg	Lettuce	Increased shoot/root length ratio	[56]
Cu	0, 10, 20 mg/L	Lettuce	Negative effects on nutrient content, dry biomass, water content and seedlings growth	[53]
Cu	0-1000 mg/L	Cucumber	Reduced growth and increased antioxidant enzymes	[57]
Cu	10-1000 mg/L	Radish, grasses	DNA damage, growth inhibition	[58]
Cu	50-500 mg/L	Tomato	Improved fruit firmness and antioxidant content	[59]
Cu	0, 20, 80 mg/Kg	Cilantro	Reduced germination and shoot elongation	[60]
Cu	100, 250, 500 ppm	Bean	Growth inhibition and nutrition imbalance	[61]
Cu	100-500 mg/L	Garden pea	Reduced plant growth and enhanced ROS production and lipid peroxidation	[62]
Zn	1000 mg/Kg	Cucumber	Root tip deformation and growth inhibition	[63]
Zn	500 mg/Kg	Garden pea	Decreased chlorophyll and H ₂ O ₂ contents	[64]
Zn	1000 mg/L	Spinach	Growth reduction	[65]
Zn	1 mg/ mL	Tomato, eggplant	Reduced fungal disease	[66]
Zn	100, 200, 500 ppm	Chili pepper	Improved germination	[67]
Zn	0-400 mg/Kg	Coriander	Improved pigment contents and defense responses	[68]
Zn	5,10, 20 mg/L	Onion	Inhibition of root growth	[69]

the delivery of the product, as well as an enhancement in shelf life by reduction of desiccation [78]. Nevertheless, there is a fundamental problem in nanobiofertilizers production, since the nanoscale constructs are usually smaller than cells. In this regard, macroscopic filters made of radially aligned carbon nanotube walls, which can absorb *Escherichia coli*, could be used as a promising technology to collect other microorganisms from fermentation processes and deliver them to the plants [73,79]. Therefore, nanobiofertilizers can solve some limitations of biofertilizers, but this technology still requires further research and development.

4. Nanofertilizers for abiotic stress tolerance

Plant productivity depends on a combination of various vital factors such as soil fertility, good quality irrigation water, and an appropriate light intensity and temperature, among other environmental factors, so that any deviation in one or more of these factors causes adverse effects on plant productivity [80]. Unfortunately, during the crop growth cycle, a plant has to constantly face several biotic and abiotic stresses. Drought, heat, salinity, waterlogging, and cold, among others, are major abiotic stresses that cause huge losses to agriculture globally by reducing yield and product quality [81]. Being sessile in nature, plants must combat these stresses *in situ*. These stresses either individually or in combination, negatively affect the morphological, physiological, biochemical and molecular changes in plants that ultimately decrease

productivity [82]. In recent years, in view of climate change the severity of these abiotic stresses is expected to increase in the upcoming decades that clearly depict a threat for crop production [81]. In this context, there is an increased interest towards the use of nanotechnology in the agriculture sector [83]. Different types of nanomaterials have been evaluated for their possible role in managing different abiotic stresses, and a summary of their positive, negative and neutral effects on various crops under various abiotic stresses is shown in Table 2.

Numerous studies have been performed for the endurance of abiotic stresses with different nanomaterials resulting both in positive or negative impacts on plant growth under abiotic stress conditions [38,102]. Applications of silver (Ag) nanoparticles (20 nM; 0.05, 0.5, 1.5, 2 and 2.5 mg L⁻¹) suspensions were tested on germination and growth of *Solanum lycopersicum* L. under two levels (150 and 100 mM) of salinity and observed that the germination rate, germination percentage, seedling fresh and dry weights and root length were improved under salinity. Furthermore, evaluation of salt stress-related genes using semi-quantitative RT-PCR showed that exposure to AgNPs caused upregulation of four genes (*AREB*, *P5CS*, *MAPK2* and *CRK1*) and down-regulation of three genes (*TAS14*, *ZFHD1* and *DDF2*) under salt stress [100]. Also, the nanotoxicity of AgNPs was evaluated and compared to AgNO₃ (both at 500 μM and 1000 μM applied with nutrient solution) in *Cucumis sativus* and reported that increasing concentration of both AgNPs and AgNO₃ posed adverse effect on seedling growth, but the



Fig. 3. Mechanisms of action of nanobiofertilizers in crops. A diagram indicating the major beneficial effects of nanobiofertilizers.

Table 2

Impact of different nanomaterials on various crops under stressful conditions. Abbreviations: MDA, malondialdehyde; MWCNT: Multi-walled carbon nanotubes; SWCNT: Single-walled carbon nanotube; NP: Nanoparticle; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase.

Application method	Type	Concentration	Plant species	Type of stress	Effects	Reference
Pre-sowing	MWCNT	10, 20, 40, 60 mg/L	Cabbage	Salinity	Increased growth, water uptake and net assimilation of CO ₂ . Induced alterations in lipid rigidity, composition and permeability in the root plasma membranes	[5]
Pre-sowing	SiO ₂	0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5 g/L	Pumpkin	Salinity	Enhanced seed germination, growth, photosynthetic parameters and antioxidant enzymes activity. Reduced MDA, H ₂ O ₂ , chlorophyll degradation and oxidative damage	[84]
Pre-sowing	Nano-silicon	10 mg/L	Hollyhock	Salinity	Increased germination, plant height, relative water content, fresh and dry weights, relative growth rate, total soluble sugars and membrane stability	[85]
Pre-sowing	Nano-urea modified with hydroxyapatite	0, 25, 50, 100%	Almond	Salinity	Increased germination and length, diameter, and number of secondary roots/plant	[86]
Pre-sowing	TiO ₂	0. 25%	Spinach	Excessive light	Increased antioxidant enzymes activity, decreased accumulation of reactive oxygen species and MDA.	[87]
Pre-sowing	Ag	0, 40, 80, 120 mg/L	Saffron	Flooding	Increased root growth, dry leaf weight and root length	[88]
Pre-sowing	Hydroxyapatite	0.5,10,20 g/kg	Bok choy	Cd stress	Increased biomass, levels of chlorophyll and vitamin C, activities of SOD, CAT, and POD, and decreased the levels of MDA	[89]
Pre-sowing	MWCNT	0, 125, 250, 500, 1000 µg/mL	Zucchini	Drought	Reduced germination percentage, vigor index, biomass accumulation, root and shoot length in a dose-dependent manner	[90]
Pre-sowing	Nano-selenium	1, 4, 8, 12 µM	Ajwain	High and low temperature	Improved plant growth, chlorophyll and leaf relative water content	[91]
Post-sowing	TiO ₂	0.05, 0.1, 0.2 g/L	Tomato	Heat stress	Enhanced photosynthesis by regulating energy dissipation, and caused cooling of leaves through inducing stomatal opening	[92]
Pre-sowing	CuO, Al ₂ O ₃ , TiO ₂	0, 20, 200, 2000 µg/mL	Onion	Oxidative stress	Induced chromosomal aberrations effect SOD and POD activities as well	[69]
Pre-sowing	SiO ₂	0.05, 0.5, 1.5, 2, 2.5 mg/L	Tomato	Salinity	Up-regulated the expression profile of salt stress genes (<i>AREB</i> , <i>TAS14</i> , <i>NCED3</i> and <i>CRK1</i>).	[93]
Pre-transplanting	Ag	10, 20, 40 mg/L	Tomato	Salinity	Negatively affected the plant height, number of branches and fruit traits (diameter, weight and number of fruits).	[94]
Post-transplanting	Chitosans-PVA, Cu	10 mg of Cu along with 1 g Cs-PVA	Tomato	Salinity	Enhanced plant growth, promoted expression of jasmonic acid and the enzyme SOD genes.	[95]
Post-transplanting	Si	1, 2, 4, 5 cm ³ /L	Chili pepper	Salinity	Significantly regulated the plant to endure salt stress.	[67]
Post-transplanting	Nano-Ca	0.5, 1, 2, 3 g/L	Tomato	Salinity	Lower level significantly reduced the negative effects of salinity	[96]
Post-transplanting	Monopotassium phosphate, nano-calcium	0.5, 0.75, 1 g/L	Tomato	Salinity	Medium concentration of NMs improved stem diameter and number of flowers.	[97]
Post-transplanting	Nano-silicon	0, 1, 2 mM	Tomato	Salinity	Improve fresh weight, chlorophyll concentration, photosynthetic rate and leaf water content	[98]
Post-transplanting	Na ₂ SiO ₃	10 µM SiNP	Pea	Cr (VI)	Reduced uptake of Cr (VI) and oxidative stress, up-regulated antioxidant defense system and enhanced accumulation of nutrients	[99]
Foliar application	Nano-silicon	1, 2 mM	Peregrina	Salinity	Enhanced vegetative parameters and chemical constituents, meanwhile decreased accumulation of Na, Cl and total phenolics and flavonoids in leaves	[100]
Foliar application	Ag	0.4, 40 mg/plant	Cucumber	Oxidative stress (Nanotoxicity)	Enhanced respiration, inhibited photorespiration and reduced inorganic nitrogen fixation.	[101]

severity of AgNO_3 was greater than that of AgNPs . Moreover, prominent disintegration of endodermis and degeneration of root cortical cells was observed in seedlings exposed to AgNO_3 . Therefore, AgNPs was less toxic than AgNO_3 and possess more potential for *C. sativus* production [103]. Recently, the role of nano-calcium (LITHOVIT®), glycinebetaine (GB), acetylsalicylic acid (aspirin) and monopotassium-phosphate fertilizers were evaluated for relieving salt stress in *Solanum lycopersicum*, and it was found that LITHOVIT® was the most effective, increasing the fruit number and yield by 76% [104].

The effect of 0, 10, 50 and 100 mg L^{-1} of SiO_2 nanoparticles (10–15 nm size) were studied on vegetative, physiological and biochemical characteristics of *Prunus mahaleb* under drought. High doses of SiO_2NPs suspensions provided with irrigation water before imposing drought treatments were more effective than low doses in alleviating drought stress to *P. mahaleb* [102]. The effects of iron nanoparticles and salicylic acid (SA) were examined for drought tolerance under *in vitro* conditions in *Fragaria × ananassa* Duch [105]. They reported that applied iron NPs in suitable concentrations increased the drought stress tolerance by optimizing iron nutrition and alleviated the negative effects associated with drought conditions. In another study, it was reported that *Ocimum basilicum* plants were better able to endure drought stress under the combined effect of gibberellin (GA_3) and TiO_2 [106]. Although AgNPs showed no positive impact on yield in *Carum copticum* [107], SiNPs could improve tomato plants performance under a short-term exposure to heat/cold stress [91]. In another study, multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) showed negative effect on germination percentage, vigor index, biomass accumulation, and root and shoot lengths in a dose-dependent manner in *Cucurbita pepo* under drought and well-watered conditions. The authors inferred that the poor germination and growth of seedlings fed with different concentrations (0, 125, 250, 500 and $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) of MWCNTs were associated with changes in the activation of antioxidant enzymes [90]. Similarly, application of cobalt ferrite (CoFe_2O_4) nanoparticles also showed a varied effect in tomato grown in hydroponics [62]. They found that CoFe_2O_4 NPs had no effect on germination and growth of tomato plants, whereas their highest level (1000 mg L^{-1}) enhanced root growth. At 250 mg L^{-1} or higher CoFe_2O_4 NPs concentrations, reduced translocation of Mg and Ca was observed. Catalase activity also decreased in the leaves and roots of *L. esculentum* on exposure to CoFe_2O_4 NPs. Therefore, keeping in view the positive and negative effects on crops, it is mandatory to explore the role of different nanomaterials in a dose-dependent and plant species manner under both laboratory and field conditions before recommending any practical advice for their use in agriculture [108].

5. Limitation of nanofertilizers

In the context of sustainable agriculture, recent progress is undoubtedly witnessing the successful use of some nanofertilizers for achieving enhanced crop productivity. However, the deliberate introduction of this technology in agricultural activities could result in many unintended non-reversible outcomes [13]. In this scenario, new environmental and unintended health safety issues can limit the use of this technology in horticultural crops' productivity. Nanomaterial phytotoxicity is also an issue in this regard since different plants respond differently to various nanomaterials in a dose-dependent manner [84]. Hence, it is crucial to consider the advantages of nanofertilizers, but also their limitations before market implementation (Fig. 4).

Importantly, nanomaterials are very reactive because of their minute size with enhanced surface area [101]. Reactivity and variability of these materials are also a concern. This raises safety concerns for farm workers who may become exposed to xenobiotics during their application [109]. These include not only those exposed to nanofertilizer manufacturing but also nanofertilizer application in the field. Considering the anticipated benefits, there is consequently a need to explore the feasibility and suitability of these new smart fertilizers. Indeed, a considerable concern about their transport, toxicity and [112],

bioavailability as well as unintended environmental impacts upon exposure to biological systems, limit their acceptance to adoption in sustainable agriculture and the horticulture sectors [8]. Risk assessment and hazard identification of the nanomaterials including nanomaterial or fertilizer life cycle assessment are critical as well as establishing priorities for toxicological research. This is particularly true considering the accumulation of nanoparticles in plants and potential health concerns. Indeed, the use of nanofertilizers derived from nanomaterials have raised serious concerns related to food safety, human and food security [110,111].

Some studies have reported phytotoxic effect of nanoparticles and the uptake, translocation, transformation and accumulation (phytotoxicity) of NPs in plants is dependent on species, dose and application method as well as type of NPs (composition, size, shape, surface properties) [112]. Examination of the degree of toxicity of each NP in any given crop is important to study and understand the uptake and translocation of nanofertilizers, the possible transformation of nanoparticles when they interact with soil and plant compounds, and the accumulation of NPs in different plant tissues [113].

Uptake and translocation of nanomaterials

Nanofertilizers can be absorbed by crops through the roots or leaves. NPs can penetrate root epidermis and endodermis reaching the xylem vessels, allowing it to be transported to the aerial part of the plant. Moreover, NPs can be absorbed by leaf stomata and transported to other plant parts through the phloem [112]. In both cases, NPs must penetrate the cell wall by pores, and pore sizes may range 3–8 nm. Therefore, only NPs smaller than 8 nm could pass through pores and reach the plasma membrane. Accordingly, NPs or aggregates bigger than 8 nm cannot enter into cells [114]. It was recently shown that tomato roots can absorb 3.5 nm Au NPs but not 18 nm Au NPs [2]. It has been shown that CeO_2 NPs can be absorbed by cucumber leaves and consequently transported to different plant tissues [115] and Ag NPs could be absorbed and distributed throughout the plant after foliar exposure in lettuce plants [116].

The uptake and translocation of nanoparticles may vary from plant to plant depending on its particular physiology and several mechanisms of their uptake, transport and distribution within the plant [117]. In several cases, plants activate defense responses against NPs. This appears to be particularly true for the metallic oxide-based nanofertilizers, in which the plant faces the parent nanomaterials effects as well as the metal ions produced by the dissolution of engineered nanofertilizers [111,118]. An experiment with carrots comparing metal oxide nanoparticles (ZnO , CuO , or CeO_2) and metal ions uptake demonstrated that uptake of both nanometal oxides and metal ions occurred. Such uptake and accumulation in edible parts may impose not only problems to the physiology of plants, but also pose serious risks to human health [110]. It was shown in this study that metal oxide nanoparticles accumulated in the outer layer of carrot and did not enter the fleshy part, while metal ions entered the fleshy edible part and were potentially more toxic to human health. It was suggested that this outer layer acts as a barrier to restrict the inward penetration of engineered nanoparticles in the edible tissues [110]. Therefore, peeling the outer layer of root and tuberous vegetables will be required to reduce the toxic exposure to these metal nanoparticles [111].

Transformation of nanoparticles

Nanomaterials are highly reactive. Therefore, when nanofertilizers are used in crops and they interact with different components in the environment, they are subject to transformations and changes in their physicochemical properties [119]. NPs interact with organic and inorganic substances in the soil, as well as with various plant components that may alter the behavior, fate, and toxicity of NPs. When nanofertilizers are used in roots, NPs are exposed to root exudates in

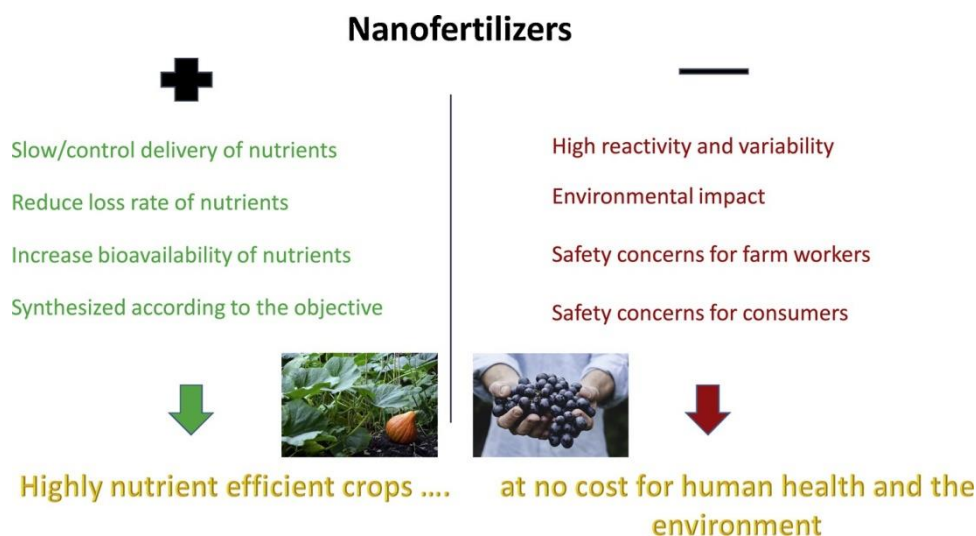


Fig. 4. Advantages and limitations of nanofertilizers. A correct use of nanofertilizers to improve crop yields requires before market implementation a careful examination not only of their advantages for the physiology of plants, but also of their potential limitations for the environment and human health.

rhizosphere that can determine the behavior and toxicity of heavy metals. For example, mesquite plants treated with Ni-(OH)₂ NPs had Ni (OH)₂ in the roots but contained Ni NPs in the shoots and leaves, demonstrating the biotransformation process of this nanoparticle inside the plant [120].

Other cases of biotransformation have been observed using CeO₂ NPs in cucumber plants. Results showed 15% of Ce(IV) being reduced to Ce(III) in the roots and 20% to Ce(III) in the shoots [26]. However, another study showed that CeO₂ NPs biotransformation did not happen in cucumber roots, suggesting that NPs biotransformation requires specific conditions in the plant rhizosphere [121]. Biotransformation was also demonstrated in Ag NPs applied on lettuce plants. Ag NPs were oxidized and Ag⁺ ions formed Ag complexes with thiol-containing molecules [122]. Also, in another experiment using Ag NP in lettuce, it was found that 33% of the NPs was transformed to Ag-glutathione [123].

Accumulation of nanoparticles

Among the various issues, the most important might be the accumulation of nanoparticles in plants and their food parts. The accumulation of nanoparticles depends on many factors, but mainly on plant species, tissue/organ that will be used directly as food or for food processing, and nanoparticle type and size. Because of the variability in interactions between NPs and plants, nanomaterials used in nanofertilizers can accumulate in plants and, in some cases, they can cause toxicity problems, not only to plants but also to humans [118]. For example, multi-walled carbon nanotubes induce phytotoxicity in red spinach (*Amaranthus tricolor* L.) causing growth inhibition, production of reactive oxygen species and cell death [68]. CeO₂ nanoparticles can accumulate and shut down the nitrogen fixation potential of soybean [113], thus not only threatening the future of leguminous crops in agriculture but also cause human health problems. Further, in another experiment, application of C₆₀ (fullerene) to zucchini, soybean, and tomato plants increased the accumulation of dichlorodiphenyldichloroethylene (DDT) [124].

Further research and strategies to cope with toxicity problems

Nanofertilizers present a great opportunity in agriculture, but it is necessary to work on strategies that cope with their accumulation and potential risks for human health and the environment, while adopting

the advantages of using nanoparticles in crops. This young field of research is achieving important goals and present an opportunity in the future. Thus far, *in vitro* analyses have been developed to help in the standardization of the correct dose and type of nanofertilizer recommended for each application and crop species, so that any potential toxicity to the environment, crops and food is minimized [125]. Another important issue to take in account, but still little explored to date, is not only the specific accumulation of NPs in edible parts of crops but the bioavailability of the accumulated NPs to the next trophic level. In this regard, specific studies of NPs bioavailability in edible parts are urgently needed to use nanofertilizers safely.

6. Conclusions and future prospects

Nanofertilizers have a significant impact in the agriculture sector for achieving enhanced productivity and resistance to abiotic stresses. Thus, promising applications of nanofertilizers in the agrifood biotechnology and horticulture sectors cannot be overlooked. Furthermore, the potential benefits of nanofertilizers have stimulated a great interest to increase the production potential of agricultural crops under the current climate change scenario. The basic economic benefits of the use of nanofertilizers are reduced leaching and volatilization associated with the use of conventional fertilizers. Simultaneously, the well-known positive impact on yield and product quality has a tremendous potential to increase growers' profit margin through the utilization of this technology. However, despite the exciting outcomes of nanofertilizers in the field of agriculture, so far, their relevance has not yet been focused towards marketability. Uncertainty related to the interaction of nanomaterials with the environment and potential effects on human health must be explored in detail before spreading nanofertilizers at a commercial scale. Future studies must be focused on generating comprehensive knowledge in these underexplored areas in order to introduce this novel frontier in sustainable agriculture. Consequently, nanofertilizer application safety and the study of the toxicity of different nanoparticles used for nanofertilizer production must be a research priority. Furthermore, an in-depth evaluation of the effect of nanofertilizers in the soils with different physico-chemical properties is necessary in order to recommend a specific nanofertilizer for a specific crop and soil type. Biosynthesized nanoparticles-based fertilizers and nanobiofertilizers should be explored further as a promising technology in order to improve yields while achieving sustainability.

Acknowledgements

The authors gratefully thank Dr. Shawn R. Wright (University of Kentucky, USA) for critically reading the manuscript and language corrections. SMB is indebted to the Catalan government for the ICREA Academia award.

References

- [1] S.K. Malhotra, Water soluble fertilizers in horticultural crops - an appraisal, *Ind. J. Agric. Sci.* 86 (2016) 1245–1256.
- [2] X. Zhang, et al., Managing nitrogen for sustainable development, *Nature* 528 (2015) 51–59.
- [3] K.A. Congreves, L.L. Van Eerd, Nitrogen cycling and management in intensive horticultural systems, *Nutr Cycl. Agroecosys.* 102 (2015) 299–318.
- [4] H. Chhipa, Nanofertilizers and nanopesticides for agriculture, *Environ. Chem. Lett.* 15 (2017) 15–22.
- [5] L.L. Van Eerd, et al., Comparing soluble to controlled-release nitrogen fertilizers: storage cabbage yield, profit margins, and N use efficiency, *Can. J. Plant Sci.* 98 (2018) 815–829.
- [6] S. Lü, et al., Multifunctional environmental smart fertilizer based on L-aspartic acid for sustained nutrient release, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 4965–4974.
- [7] R. Raliya, V. Saharan, C. Dimkpa, P. Biswas, Nanofertilizer for precision and sustainable agriculture: current state and future perspectives, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2017) 6487–6503.
- [8] A.A. Feregrino-Pérez, E. Magaña-López, C. Guzmán, K. Esquivel, A general overview of the benefits and possible negative effects of the nanotechnology in horticulture, *Sci. Hortic.* 238 (2018) 126–137.
- [9] H. Chhipa, P. Joshi, Nanofertilisers, Nanopesticides and Nanosensors, *Agriculture, in Nanoscience in Food and Agriculture*, 2016, pp. 247–282.
- [10] P. Solanki, A. Bhargava, H. Chhipa, N. Jain, J. Panwar, Nano-fertilizers and their smart delivery system, *Agriculture, in Nanoscience in Food and Agriculture*, (2016), pp. 81–101J.
- [11] X. Chen, Wei, Controlled-release Fertilizers As a Means to Reduce Nitrogen Leaching and Runoff in Container-grown Plant Production, *Nitrogen in Agriculture-Updates*, InTech, 2018, pp. 33–52.
- [12] R. Liu, R. Lal, Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions, *Sci. Total Environ.* 514 (2015) 131–139.
- [13] M. Kah, Nanopesticides and nanofertilizers: emerging contaminants or opportunities for risk mitigation? *Front. Chem.* 3 (2015) 64.
- [14] D.Y. Kim, et al., Recent developments in nanotechnology transforming the agricultural sector: a transition replete with opportunities, *J. Sci. Food Agric.* 98 (2018) 849–864.
- [15] C.M. Monreal, M. Derosa, S.C. Mallubhotla, P.S. Bindrabn, C. Dimkpa, Nanotechnologies for increasing the crop use efficiency of fertilizer-micro-nutrients, *Biol. Fert. Soils* 52 (2016) 423–437.
- [16] R. Raliya, J.C. Tarafdar, ZnO nanoparticle biosynthesis and its effect on phosphorous-mobilizing enzyme secretion and gum contents in clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* L.), *Agric. Res.* 2 (2013) 48–57.
- [17] R. Raliya, P. Biswas, J.C. Tarafdar, TiO₂ nanoparticle biosynthesis and its physiological effect on mung bean (*Vigna radiata* L.), *Biotechnol. Rep.* 5 (2015) 22–26.
- [18] R. Raliya, J.C. Tarafdar, P. Biswas, Enhancing the mobilization of native phosphorus in the mung bean rhizosphere using ZnO nanoparticles synthesized by soil fungi, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 3111–3118.
- [19] W. Tan, et al., Surface coating changes the physiological and biochemical impacts of nano-TiO₂ in basil (*Ocimum basilicum*) plants, *Environ. Pollut.* 222 (2017) 64–72.
- [20] N. Zuverza-Mena, et al., Exposure of engineered nanomaterials to plants: insights into the physiological and biochemical responses-A review, *Plant Physiol. Biochem.* 110 (2017) 236–264.
- [21] G.N. Rameshaiah, J. Pallavi, S. Shabnam, Nano fertilizers and nano sensors—an attempt for developing smart agriculture, *Int. J. Eng. Res. Gen. Sci.* 3 (2015) 314–320.
- [22] I. Iavicoli, V. Leso, D.H. Beezhold, A.A. Shvedova, Nanotechnology in agriculture: opportunities, toxicological implications, and occupational risks, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 329 (2017) 96–111.
- [23] C.O. Dimkpa, P.S. Bindrabn, Nanofertilizers: new products for the industry? *J. Agric. Food Chem.* 66 (2017) 6462–6473.
- [24] R. Prasad, A. Bhattacharyya, Q.D. Nguyen, Nanotechnology in sustainable agriculture: recent developments, challenges, and perspectives, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1014.
- [25] El-Ramady, et al., Plant nano-nutrition: perspectives and challenges, *Nanotechnology, Food Security and Water Treatment*, (2018), pp. 129–161.
- [26] C. Ma, J.C. White, J. Zhao, Q. Zhao, B. Xing, Uptake of engineered nanoparticles by food crops: characterization, mechanisms, and implications, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 9 (2018) 129–153.
- [27] G. Cornelis, et al., Fate and bioavailability of engineered nanoparticles in soils: a review, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 44 (2014) 2720–2764.
- [28] S. Fan, Ending hunger and undernutrition by 2025: the role of horticultural value chains, in: *XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: sustaining lives, Livelihoods and Landscapes* (2014) 9–20.
- [29] S. León-Silva, R. Arrieta-Cortés, F. Fernández-Luqueño, F. López-Valdez, Design and production of nanofertilizers, *Agricultural Nanobiotechnology*, (2018), pp.17–31.
- [30] M. Kah, R.S. Kookana, A. Gogos, T.D. Bucheli, A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues, *Nat. Nanotechnol.* 13 (2018) 667–684.
- [31] F. López-Valdez, M. Miranda-Arámbula, A.M. Rios-Cortés, F. Fernández-Luqueño, V. de la Luz, Nanofertilizers and their controlled delivery of nutrients, *Agricultural Nanobiotechnology*, (2018), pp. 35–48.
- [32] A.K. Srivastava, S.K. Malhotra, Nutrient use efficiency in perennial fruit crops - A review, *J. Plant Nutr.* 40 (2017) 1928–1953.
- [33] M.C. Kyriacou, Y. Roupael, Towards a new definition of quality for fresh fruits and vegetables, *Sci. Hortic.* 234 (2018) 463–469.
- [34] G. Singh, H. Rattanpal, Use of nanotechnology in horticulture: a review, *Int. J. Agric. Sci. Vet. Med* 2 (2014) 34–42.
- [35] S. Pradhan, D.R. Mailapalli, Interaction of engineered nanoparticles with the agri-environment, *J. Agric. Food Chem.* 65 (2017) 8279–8294.
- [36] T.P. Yadav, R.M. Yadav, D.P. Singh, Mechanical milling: a top down approach for the synthesis of nanomaterials and nanocomposites, *Nanosci. Nanotechnol.* 2 (2012) 22–48.
- [37] A. Ingale, A.N. Chaudhari, Biogenic synthesis of nanoparticles and potential applications: an eco-friendly approach, *J. Nanomed. Nanotechnol.* 4 (2013) 2.
- [38] L.R. Khot, S. Sankaran, J.M. Maja, R. Ehsani, E.W. Schuster, Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: a review, *Crop Prot.* 35 (2012) 64–70.
- [39] S. Davarpanah, A. Tehranifar, G. Davarynejad, J. Abadia, R. Khorasani, Effects of foliar applications of zinc and boron nano-fertilizers on pomegranate (*Punica granatum* cv. Ardestani) fruit yield and quality, *Sci. Hortic.* 210 (2016) 57–64.
- [40] S. Davarpanah, et al., Effects of foliar nano-nitrogen and urea fertilizers on the physical and chemical properties of Pomegranate (*Punica granatum* cv. Ardestani) fruits, *HortScience* 52 (2017) 288–294.
- [41] A. Ditta, M. Arshad, Applications and perspectives of using nanomaterials for sustainable plant nutrition, *Nanotechnol. Rev.* 5 (2016) 209–229.
- [42] P. Wang, E. Lombi, F.J. Zhao, P.M. Kopitke, Nanotechnology: A new opportunity in plant sciences, *Trends Plant Sci.* 21 (2016) 699–712.
- [43] S. Patra, P. Mishra, S.C. Mahapatra, S.K. Mithun, Modelling impacts of chemical fertilizer on agricultural production: a case study on Hooghly district, West Bengal, India, *Mod. Earth Sys. Environ.* 2 (2016) 180.
- [44] N.L. Sharonova, et al., Nanostructured water-phosphorite suspension is a new promising fertilizer, *Nanotech. Russia* 10 (2015) 651–661.
- [45] S. Noreen, Z. Fatima, S. Ahmad, M. Ashraf, Foliar application of micronutrients in mitigating abiotic stress in crop plants, *Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance*, Springer, Singapore, 2018, pp. 95–117.
- [46] M.R. Broadley, P.J. White, J.P. Hammond, I. Zelko, A. LuX, Zinc in plants, *New Phytol.* 173 (2007) 677–702.
- [47] E. Navarro-León, A. Albacete, A. de la Torre-González, J.M. Ruiz, B. Blasco, Phytohormone profile in *Lactuca sativa* and *Brassica oleracea* plants grown under Zn deficiency, *Phytochemistry* 130 (2016) 85–89.
- [48] E.M. Mattiello, H.A. Ruiz, J.C. Neves, M.C. Ventrella, W.L. Araújo, Zinc deficiency affects physiological and anatomical characteristics in maize leaves, *J. Plant Physiol.* 183 (2015) 138–143.
- [49] S. Moghaddasi, et al., Bioavailability of coated and uncoated ZnO nanoparticles to cucumber in soil with or without organic matter, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 144 (2017) 543–551.
- [50] J.C. Tarafdar, R. Raliya, H. Mahawar, I. Rathore, Development of zinc nanofertilizer to enhance crop production in pearl millet (*Pennisetum americanum*), *Agric. Res.* 3 (2014) 257.
- [51] N.G.M. Palmqvist, G.A. Seisenbaeva, P. Svedlindh, V.G. Kessler, Maghemite nanoparticles acts as nanozymes, improving growth and abiotic stress tolerance in *Brassica napus*, *Nanoscale Res. Lett.* 12 (2017) 631.
- [52] C.P. Sharma, *Plant Micronutrients*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2006.
- [53] J. Trujillo-Reyes, S. Majumdar, C.E. Botez, J.R. Peralta-Videa, J.L. Gardea-Torresdey, Exposure studies of core-shell Fe/Fe₃O₄ and Cu/CuO NPs to lettuce (*Lactuca sativa*) plants: are they a potential physiological and nutritional hazard? *J. Hazard. Mat.* 267 (2014) 255–263 1166.
- [54] L. Giorgetti, et al., An integrated approach to highlight biological responses of *Pisum sativum* root to nano-TiO₂ exposure in a biosolid-amended agricultural soil, *Sci. Total Environ.* 650 (2019) 2705–2716.
- [55] C. Musante, J.C. White, Toxicity of silver and copper to *Cucurbita pepo*: differential effects of nano and bulk-size particles, *Environ. Toxicol.* 27 (2012) 510–517.
- [56] J. Hong, et al., Toxic effects of copper-based nanoparticles or compounds to lettuce (*Lactuca sativa*) and alfalfa (*Medicago sativa*), *Environ. Sci. Process. Impact* 17 (2015) 177–758 185.
- [57] S. Kim, S. Lee, I. Lee, Alteration of phytotoxicity and oxidant stress potential by metal oxide nanoparticles in *Cucumis sativus*, *Water Air Soil Pollut.* 223 (2012) 2799–2806.
- [58] D.H. Atha, et al., Copper oxide nanoparticle mediated DNA damage in terrestrial plant models, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 1819–1827.
- [59] B. Ahmed, M.S. Khan, J. Musarrat, Toxicity assessment of metal oxide nanoparticles on tomato (*Solanum lycopersicon*): a study on growth dynamics and plant cell death, *Environ. Pollut.* 240 (2018) 802–816.
- [60] N. Zuverza-Mena, et al., Copper nanoparticles/compounds impact agronomic and physiological parameters in cilantro (*Coriandrum sativum*), *Environ. Sci. Process. Impact* 17 (2015) 1783–1793.
- [61] A.H. Alsaedi, et al., Engineered silica nanoparticles alleviate the detrimental effects of Na⁺ stress on germination and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*), *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 21917–21928.
- [62] D.K. Tripathi, et al., Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced

- phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings, *Plant Physiol. Biochem.* 110 (2017) 167–177.
- [63] L. Zhao, et al., CeO₂ and ZnO nanoparticles change the nutritional qualities of cucumber (*Cucumis sativus*), *J. Agri. Food Chem.* 62 (2014) 2752–2759.
- [64] P.M.G. Nair, I.M. Chung, The responses of germinating seedlings of green peas to copper oxide nanoparticles, *Biol. Plant* 59 (2015) 591–595.
- [65] L. Zheng, F. Hong, S. Lu, C. Liu, Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach, *Biol. Trace Elem. Res.* 104 (2005) 83–91.
- [66] M. Khan, Z.A. Siddiqui, Zinc Oxide Nanoparticles for the Management of *Ralstonia solanacearum*, *Phomopsis Vexans* and *Meloiodogyne incognita* Incited Disease Complex of Eggplant, *Indian Phytopathology*, 2018, pp. 1–10.
- [67] A.S. Tantawy, Y.A.M. Salama, M.A. El-Nemr, A.M.R. Abdel-Mawgoud, Nano silicon application improves salinity tolerance of sweet pepper plants, *Int. J. Chem. Tech. Res.* 8 (2015) 11–17.
- [68] V.L.R. Pullagurala, et al., ZnO nanoparticles increase photosynthetic pigments and decrease lipid peroxidation in soil grown cilantro (*Coriandrum sativum*), *Plant Physiol. Biochem.* 132 (2018) 120–127.
- [69] B. Ahmed, M. Shahid, M.S. Khan, J. Musarrat, Chromosomal aberrations, cell suppression and oxidative stress generation induced by metal oxide nanoparticles in onion (*Allium cepa*) bulb, *Metallomics* 10 (2018) 1315–1327.
- [70] C. Kole, et al., Nanobiotechnology can boost crop production and quality: first evidence from increased plant biomass, fruit yield and phytochemistry content in bitter melon (*Momordica charantia*), *BMC Biotechnol.* 13 (2013) 1.
- [71] E. Malusá, N. Vassilev, A contribution to set a legal framework for biofertilisers, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (2014) 6599–6607.
- [72] B.K. Singh, C. Sarma, Keswani (Eds.), *Agriculturally Important Microorganisms: Commercialization and Regulatory Requirements in Asia*, Springer, Singapore, 2016, pp. 133–145.
- [73] T. Simarmata, T. Hersanti, N. Turmuktini, R. Betty Fitriatin, Mieke Setiawati, Purwanto, Application of bioameliorant and biofertilizers to increase the soil health and rice productivity, *Hayati J. Biosci.* 23 (2016) 181–184.
- [74] E. Malusá, L. Sas-Paszt, J. Ciesielska, Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers, *Transfus. Apher. Sci.* (2012) 491206.
- [75] S.K. Shukla, et al., Prediction and validation of gold nanoparticles (GNPs) on plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a step toward development of nano-biofertilizers, *Nanotechnol. Rev.* 4 (2015) 439–448.
- [76] J.S. Duhan, R. Kumar, N. Kumar, P. Kaur, K. Nehra, S. Duhan, Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture, *Biotechnol. Rep. Amst.* 15 (2017) 11–23.
- [77] J. Jampilek, K. Kráľová, Nanomaterials for delivery of nutrients and growth-promoting compounds to plants, in: R. Prasad, M. Kumar, V. Kumar (Eds.), *Nanotechnology: An Agricultural Paradigm*, Springer, Singapore, 2017, pp. 177–226.
- [78] S. Kaushik, S.R. Djiwanti, Nanotechnology for enhancing crop productivity, in: R. Prasad, M. Kumar, V. Kumar (Eds.), *Nanotechnology: An Agricultural Paradigm*, Springer, Singapore, 2017, pp. 249–262.
- [79] J. Vanderghenst, H. Scher, H.Y. Guo, D. Schultz, Water-in-oil emulsions that improve the storage and delivery of the biolarvacide *Lagenidium giganteum*, *BioControl* 52 (2007) 207–229.
- [80] A. Srivastava, O.N. Srivastava, S. Talapatra, R. Vajtai, P.M. Ajayan, Carbon nanotube filters, *Nat. Mater.* 3 (2004) 610–614.
- [81] W. Wu, B. Ma, Integrated nutrient management (INM) for sustaining crop productivity and reducing environmental impact: a review, *Sci. Total Environ.* 512 (2015) 415–427.
- [82] N.S. Rao, R.H. Laxman, K.S. Shivashankara, Physiological and morphological responses of horticultural crops to abiotic stresses, *Abiotic Stress Physiology of Horticultural Crops*, Springer, New Delhi, 2016, pp. 3–17.
- [83] M.A. Ashraf, et al., Recent advances in abiotic stress tolerance of plants through chemical priming: an overview, *Advances in Seed Priming*, Springer, Singapore, 2018, pp. 51–79.
- [84] P. Ashkavand, et al., Application of SiO₂ nanoparticles as pretreatment alleviates the impact of drought on the physiological performance of *Prunus mahaleb* (ro-saceae), *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 53 (2018) 207–219.
- [85] A.M.A. Qados, A.E. Moftah, Influence of silicon and nano-silicon on germination, growth and yield of faba bean (*Vicia faba* L.) under salt stress conditions, *Am. J. Exp. Agric.* 5 (2015) 509.
- [86] A. Badran, I. Savin, Effect of nano-fertilizer on seed germination and first stages of bitter almond seedlings growth under saline conditions, *BioNanoScience* (2018) 1–10.
- [87] F.S. Hong, et al., Effect of nano-anatase TiO₂ on spectral characterization of photosystem particles from spinach, *Chem. Res. China Univ.* 21 (2005) 196–200.
- [88] N. Rezvani, A. Sorooshzadeh, N. Farhadi, Effect of nano-silver on growth of saffron in flooding stress, *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 6 (2012) 517–522.
- [89] Z. Li, J. Huang, Effects of nanoparticle hydroxyapatite on growth and antioxidant system in pakchoi (*Brassica chinensis* L.) from cadmium-contaminated soil, *J. Nanomat.* (2014) 470962.
- [90] R. Amooaghaie, F. Tabatabaei, A. Ahadi, Alterations in HO-1 expression, heme oxygenase activity and endogenous NO homeostasis modulate antioxidant responses of *Brassica nigra* against nano silver toxicity, *J. Plant Physiol.* 228 (2018) 75–84.
- [91] M. Seghatoleslami, H. Feizi, G. Mousavi, A. Berahmand, Effect of magnetic field and silver nanoparticles on yield and water use efficiency of *Carum copticum* under water stress conditions, *Polish J. Chem. Technol.* 17 (2015) 110–114.
- [92] M. Qi, Y. Liu, T. Li, Nano-TiO₂ improve the photosynthesis of tomato leaves under mild heat stress, *Biol. Trace Elem. Res.* 156 (2013) 323–328.
- [93] Z.M. Almutairi, Effect of nano-silicon application on the expression of salt tolerance genes in germinating tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seedlings under salt stress, *Plant Omics* 9 (2016) 106.
- [94] Z.M. Almutairi, Influence of silver nano-particles on the salt resistance of tomato (*Solanum lycopersicum*) during germination, *Int. J. Agric. Biol.* 18 (2016) 449–457.
- [95] M. Haghighi, M. Pesaraki, Influence of silicon and nano-silicon on salinity tolerance of cherry tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) at early growth stage, *Sci. Hortic.* 161 (2013) 111–117.
- [96] H.F. Alharby, E.M. Metwali, M.P. Fuller, A.Y. Aldhebiani, Impact of application of zinc oxide nanoparticles on callus induction, plant regeneration, element content and antioxidant enzyme activity in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) under salt stress, *Arch. Biol. Sci.* 68 (2016) 723–735.
- [97] N.A. Younes, D.M. Nassef, Effect of silver nanoparticles on salt tolerance of tomato transplants (*Solanum lycopersicum* L. Mill.), *Assiut J. Agric. Sci.* 46 (2015) 76–85.
- [98] H. Hernández-Hernández, et al., Effects of chitosan-PVA and Cu nanoparticles on the growth and antioxidant capacity of tomato under saline stress, *Molecules* 23 (2018) 178.
- [99] M. Delfani, M.B. Firouzabadi, N. Farrokhi, H. Makarian, Some physiological responses of black-eyed pea to iron and magnesium nanofertilizers, *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 45 (2014).
- [100] H.A. Ashour, A.W.M. Mahmoud, Response of *Jatropha integerrima* plants irrigated with different levels of saline water to nano silicon and gypsum, *J. Agric. Stud.* 5 (2017) 136–160.
- [101] A. Konate, et al., Comparative effects of nano and bulk-Fe₃O₄ on the growth of cucumber (*Cucumis sativus*), *Ecotoxicol. Environ. Safety* 165 (2018) 547–554.
- [102] D.K. Tripathi, V.P. Singh, S.M. Prasad, D.K. Chauhan, N.K. Dubey, Silicon nanoparticles (SiNP) alleviate chromium (VI) phytotoxicity in *Pisum sativum* (L.) seedlings, *Plant Physiol. Biochem.* 96 (2015) 189–198.
- [103] J.E. Cañas, et al., Effects of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon nanotubes on root elongation of select crop species, *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 1922–1931.
- [104] A.S. Tantawy, Y.A.M. Salama, A.M.R. Abdel-Mawgoud, A.A. Ghoname, Comparison of chelated calcium with nano calcium on alleviation of salinity negative effects on tomato plants, *Middle East J. Agric. Res.* 3 (2014) 912–916.
- [105] A.A. Mozafari, N. Ghaderi, Grape response to salinity stress and role of iron nanoparticle and potassium silicate to mitigate salt induced damage under *in vitro* conditions, *Physiol. Mol. Biol. Plants* 24 (2018) 25–35.
- [106] M. Hatami, Toxicity assessment of multi-walled carbon nanotubes on *Cucurbita pepo* L. Under well-watered and water-stressed conditions, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 142 (2017) 274–283.
- [107] H. Kiapour, P. Moaveni, D. Habibi, B. Sani, Evaluation of the application of gibberellic acid and titanium dioxide nanoparticles under drought stress on some traits of basil (*Ocimum basilicum* L.), *Int. J. Agron. Agric. Res.* 6 (2015) 138–150.
- [108] E. Vázquez-Núñez, M.L. López-Moreno, G. de la Rosa Álvarez, F. Fernández-Luqueño, Incorporation of nanoparticles into plant nutrients: the real benefits, *Agricultural Nanobiotechnology*, Springer, 2018, pp. 49–76.
- [109] P.M.G. Nair, Toxicological impact of carbon nanomaterials on plants, *Nanotechnology, Food Security and Water Treatment*, Springer, 2018, pp. 163–183.
- [110] M.L. López-Moreno, C. Cassé, S.N. Correa-Torres, Engineered nanomaterials interactions with living plants: benefits, hazards and regulatory policies, *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* 6 (2018) 36–41.
- [111] J.C. White, J. Gardea-Torresdey, Achieving food security through the very small, *Nat. Nanotechnol.* 13 (2018) 627.
- [112] S.D. Ebbs, S. Bradfield, P. Kumar, C. Musante, J.C. White, X. Ma, Accumulation of zinc, copper, or cerium in carrot (*Daucus carota*) exposed to metal oxide nanoparticles and metal ions, *Environ. Sci. Nano* 3 (2016) 114e126.
- [113] J.H. Priestner, Y. Ge, R.E. Mielke, A.M. Horst, S.C. Moritz, K. Espinosa, J. Gelb, S.L. Walker, R.M. Nisbet, Y.-J. An, J.P. Schimel, R.G. Palmer, J.A. Hernandez-Viezas, L. Zhao, J.L. Gardea-Torresdey, P.A. Holden, Soybean susceptibility to manufactured nanomaterials with evidence for food quality and soil fertility interruption, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) E2451–E2456.
- [114] N.C. Carpita, D.M. Gibeaut, Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth, *Plant J.* 3 (1993) 1–30; J. Hong, J.R. et al., Evidence of translocation and physiological impacts of foliar applied CeO₂ nanoparticles on cucumber (*Cucumis sativus*) plants, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 4376–4385.
- [115] C. Larue, et al., Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: evidence for internalization and changes in Ag speciation, *J. Hazard. Mater.* 264 (2014) 98–106.
- [116] L. Giorgetti, Effects of nanoparticles in plants: phytotoxicity and genotoxicity assessment, in: D.K. Tripathi, S. Sharma, N.K. Dubey, P. Ahmad, D.K. Chauhan (Eds.), *Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms: Concepts and Controversies*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2019, pp. 65–87.
- [117] N. Odzak, D. Kistler, R. Behra, L. Sigg, Dissolution of metal and metal oxide nanoparticles under natural freshwater conditions, *Environ. Chem.* 12 (2015) 138–148.
- [118] G.V. Lowry, G.B. Kelvin, A.C. Simon, L.R. Jamie, Transformations of nanomaterials in the environment, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 6893–6899.
- [119] H.P. Bais, T.L. Weir, L.G. Perry, S. Gilroy, J.M. Vivanco, The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms, *Annu. Rev. Plant Biol.* 57 (2006) 233–266.
- [120] J.G. Parsons, M.L. Lopez, C.M. Gonzalez, J.R. Peralta-Videa, J.L. Gardea-Torresdey, Toxicity and biotransformation of uncoated and coated nickel hydroxide nanoparticles on mesquite plants, *Environ. Toxicol. Chem.* 29 (2010) 1146–1154.

- [121] Y. Ma, et al., Xylem and phloem based transport of CeO₂ nanoparticles in hydroponic cucumber plants, *Environ. Sci. Technol.* 51 (2017) 5215–5221.
- [122] Y. Ma, et al., Where does the transformation of precipitated ceria nanoparticles in hydroponic plants take place? *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 10667–10674.
- [123] K.E. Li, Z.Y. Chang, C.X. Shen, N. Yao, Toxicity of nanomaterials to plants, in: M. Siddiqui, M. Al-Wahaibi, F. Mohammad (Eds.), *Nanotechnology and Plant*

Anexo 2

Reduced phosphate availability improves tomato quality through hormonal modulation in developing fruits



Reduced Phosphate Availability Improves Tomato Quality Through Hormonal Modulation in Developing Fruits

Míriam Navarro^{1,2} · Sergi Munné-Bosch^{1,3}

Received: 16 June 2020 / Accepted: 11 December 2020

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC part of Springer Nature 2021

Abstract

Nutrient management is one of the most important agricultural practices to ensure yield and fruit quality. The aim of this study was to examine the effect of N and P availability in the yield and quality of tomato fruits (*Solanum lycopersicum* var. Meyity), and the hormonal mechanisms underlying these effects. Fruit yield and quality (in terms of sugar accumulation and titratable acidity) at harvest, together with the hormonal profiling of developing fruits were evaluated. While low N caused a reduction of sugars, reduced P availability increased sugars and reduced acidity in fruits. These changes were not accompanied by significant reductions in yield. Enhanced *trans*-zeatin content at early stages of fruit development and during color break might be associated with an increased sink activity. Furthermore, jasmonic acid, salicylic acid and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (the ethylene precursor) concentrations increased at early stages of fruit development, thus suggesting a complex hormonal crosstalk induced by low P availability. In conclusion, a reduction of P availability increased tomato sugar contents, while yield was not negatively impacted. These results have implications to alleviate the depletion of natural P reserves to arrive at a more sustainable horticulture.

Keywords Cytokinins · Nitrogen · Phosphorus · Salicylic acid · Soluble sugars

Introduction

Tomato plants are one of the highest produced and consumed horticultural crops worldwide because of the organoleptic properties and nutritive value of their fruits (De Pablo and Battistuzzi 2012). Consequently, cultivation of tomato plants is one of the best studied and optimized agricultural practices nowadays, despite there is still strong interest in evaluating factors that influence tomato yield and quality to

arrive at a more sustainable horticulture in the current frame of global change. In this respect, nitrogen (N) and phosphorous (P) are the two major mineral nutrients required for plant growth and development that are applied in crop fertilization and previous studies have already shown that the nutritional value of tomatoes can be improved by growing them in the greenhouse by applying different agronomic techniques that influence fruit yield and quality (Erba et al. 2013). These previous findings support the idea that there is still room to improve not only yields, but most particularly fruit quality, and that this goal must be achieved associated with more sustainable agricultural practices.

On one hand, N is essential for the synthesis of nucleic acids, proteins and phospholipids. Moreover, it is required for the synthesis of other compounds such as co-enzymes, photosynthetic pigments and secondary metabolites (Adams 1986; Amtmann and Armengaud 2009; Maathuis 2009). On the other hand, P plays an essential role in plants, as it is a component of nucleic acids and phospholipids. But above all, it is a constituent of adenosine triphosphate (ATP), an energy-rich phosphate compound crucial in plant metabolism. Consequently, both N and P deficiency can reduce plant growth and yield, and consequently, these nutrients

Handling Editor: Andrzej Bajguz.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10290-2>.

✉ Sergi Munné-Bosch
smunne@ub.edu

¹ Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain

² Productes Agrícoles Macasa, Igualada, Spain

³ Institute of Nutrition and Food Safety (INSA), University of Barcelona, Barcelona, Spain

are often over applied in agriculture. However, the excess of fertilization increases nutrient losses from soil to water that cause pollution and eutrophication. Moreover, an excess of N and P can also impair crops growth (Zhu et al. 2017). Therefore, knowledge of the optimal nutrient requirement of crops is fundamental to maintain good yields and fruit quality and to minimize nutrient waste and environmental impacts (Fandi et al. 2010).

Many experiments have previously linked the availability of nutrients in crops with fruit quality (sugar content or titratable acidity). However, the effects of N and P availability on tomato are still controversial. Hernández et al. (2020) reported that a decrease in the N dose from transplant onwards in the cultivation of tomato plants resulted in a decrease in sugar concentration and yield. However, two different studies showed that a moderate reduction in N supply does not affect yield and indeed improves fruit quality through an increased total soluble sugar (TSS)/titratable acidity (TA) ratio (Truffault et al. 2019; Bénard et al. 2009). Moreover, a reduction in N fertilization was shown to exert a positive effect on vitamin C and phenolic contents, although depending on the dose N deficiency can also negatively impact tomato yield (Erba et al. 2013; Wei et al. 2018). On the other hand, Fandi et al. (2010) showed that reduced P availability can lead to higher TSS, despite Zhu et al. (2017) observed that yield and postharvest qualities were not significantly affected by P rates in a two-year experiment in tomatoes. Overall, these studies indicate that various agricultural practices must be finely controlled to achieve an optimal cultivation in greenhouse tomatoes, showing significant effects for the cultivar, N dose in nutrient solution, treatments for plant disease control and fruit ripeness, among others (Erba et al. 2013). Thus, it is important not only to study in detail the impact of nutrient availability in crops but also the mechanisms underlying these effects considering that these effects may be strongly cultivar-dependent. The aim of the present study was to examine the influence of N and P availability on the fruit yield and quality of tomato plants (*Solanum lycopersicum* L. var. Meyity), with a particular emphasis on evaluating the associated changes in the hormonal profiling during fruit development.

Materials and Methods

Experimental Design and Samplings

Seeds from tomato plants (*Solanum lycopersicum* var. Meyity), a pear tomato variety that was chosen for the study because of its commercial and economical interest, were bought at the Agricultural Cooperative Vallès (Llerona, NE Spain) Seeds were sown on perlite, vermiculite, and peat substrate on February 5th, 2018 and grown under a long

photoperiod (16 h light/ 8 h darkness regime) in a constant-environment chamber (90–110 μmol quanta m^{-2} s^{-1} , air temperature between 21 and 23 °C, and relative humidity around 65%). Three weeks later, plants were transferred into multipots with the same substrate and kept under the same conditions in the growth chamber until March 12th, 2018. Then, plants were transferred into 4L pots (one plant per pot) with the same substrate and grown in a greenhouse at the Faculty of Biology of the University of Barcelona (Barcelona, NE Spain) until the end of the study period on June 21st, 2018. After transplanting, all plants were irrigated three times a week with Hoagland solution. Fourteen days later, plants were then divided into three groups on March 26th, 2018: (1) a control group, irrigated with Hoagland solution (Hoagland and Arnon 1938); (2) a group deficient in N, irrigated with modified Hoagland solution with 20% less of N; and (3) a group deficient in P, irrigated with modified Hoagland solution in which soluble P ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ at 115.08 g/L) was replaced by insoluble P (soft ground rock phosphate). The daily mean temperature in the greenhouse during the study was 25.9 °C and the daily mean relative humidity was 58.1%. During harvest (June 20th and 21st, 2018), plants were exposed to a long photoperiod (under a 16 h light/ 8 h darkness regime), and the daily mean temperature and relative humidity were 25 °C and 55%, respectively (Suppl. Figure S1).

Fruits were sampled at six developmental, ripening stages (adapted from Takizawa et al. 2014, see Fig. 1): stage I, developing fruit with a peel that is still completely green; stage II, first color changes occur, but still less than 10% of the peel surface has started to change color; stage III, 10%–30% of the peel has changed color; stage IV overall break in color from green to yellow/pink; stage V, dark red coloration starts to appear, with 60%–90% of the surface is not green; and stage VI, mature fruit, commercial harvest (Fig. 1). For all treatments, one fruit per plant from six plants per stage and treatment were sampled at each developmental stage, dipped in liquid N_2 and stored at 80 °C until hormone profiling analyses. Moreover, six additional fruits per plant were sampled at harvest (stage VI) to analyze fruit quality parameters. All samplings were performed at predawn (1 h before sunrise).

Yield and Fruit Quality Parameters

Total production of fruits per plant was measured at first harvest (between June 20th and 21st, 2018). In addition, the fresh weight and dry weight of fruits were measured by weighing freshly harvested fruits. Tomato quality was determined by measuring total soluble sugars (TSS), titratable acidity (TA) and sugar/acid (TSS/TA) ratio. For fruit quality analysis, tomato juice was extracted. One mL of juice was used to determine TSS using a digital refractometer HI 96,801 (HANNA

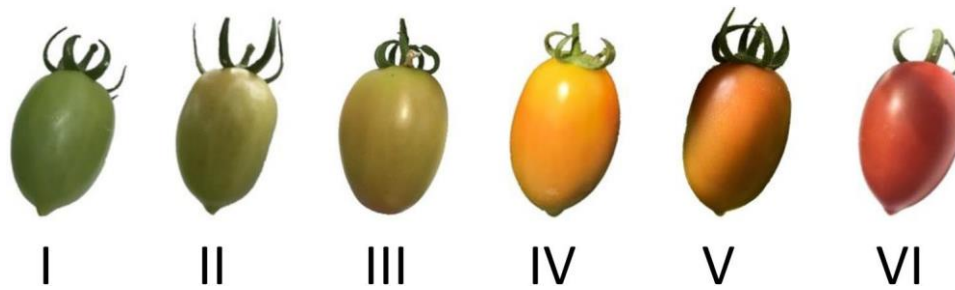


Fig. 1 Ripening stages of tomato fruits sampled during the study (from left to right, stages I–VI). Stage I, developing fruit with a peel that is still completely green; stage II, first color changes occur, but still less than 10% of the peel surface has started to change color;

stage III, 10%–30% of the peel has changed color; stage IV overall break in color from green to yellow/pink; stage V, dark red coloration starts to appear, with 60%–90% of the surface is not green; and stage VI, mature fruit, commercial harvest (color figure online)

instruments, Woonsocket, USA). Moreover, 10 mL of juice were diluted with 100 mL of distilled water and this solution was used for the determination of TA with 0.1 N NaOH, using phenolphthalein (1%) as an indicator (Latimer 2016).

Hormone Profiling

Endogenous contents of phytohormones were determined by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS), as described by Müller and Munné-Bosch (2011). In short, 100 mg of liquid N₂-grounded fruit samples were extracted with 250 mL of solvent (methanol:isopropanol:acetic acid) using ultrasonication for 30 min and vortexing. Next, the pellet was re-extracted again using ultrasonication for 30 min and vortexing and the collected supernatants were filtered through a 0.22 mm PTFE filter before analyses. Phytohormone contents were analyzed by UHPLC–MS/MS as described (Müller and Munné-Bosch 2011). Internal standards, including d₅-*trans*-zeatin, d₅-*trans*-zeatin riboside, d₆-isopentenyl adenosine, d₄-l-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, d₄-salicylic acid, d₆-abscisic acid, d₅-jasmonic acid, d₄-melatonin, d₅-indole-3-acetic acid and d₂-gibberellin₄ were used for quantification.

Statistical Analyses

Results were analyzed by one-way factorial analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey HSD post hoc tests or by two-way ANOVAs followed by Student's *t*-tests, using IBM® SPSS® Statistics 19 (Armonk, NY). Differences were considered significant at a probability level of $P < 0.05$.

Results

Impact of N and P Availability on Yield and Fruit Quality

Total crop yield (kg tomato/plant) was not negatively affected either by reduced N or P availability (Fig. 2a). The fresh or dry weight of fruits was neither affected by treatments (Figs. 2b, c). Therefore, reduced nutrient availability applied in this study did not result in significant reductions in yield. In contrast, reduced N and P availability impacted on the fruit quality parameters analyzed: total soluble sugars (TSS), titratable acidity (TA) and sugar/acid ratio (TSS/TA). TSS were affected in different ways in plants treated with low N supply or plants treated with low soluble P. TSS was reduced by 11.8% when N availability was reduced, while it increased by 7.4% when the availability of soluble P was reduced (Fig. 3a). TA was not influenced by N deficiency, but it decreased by 12.5% under reduced P availability (Fig. 3b). Finally, changes in TSS/TA paralleled those of TSS, but with even higher differences due to the reductions in TA under P deficiency. In plants with a reduced N availability, the sugar/acid ratio decreased by 12.5%, while this ratio increased by 17.8% with reduced P (Fig. 3c).

Impact of N and P Availability on the Hormonal Profiling of Maturing Fruits

The endogenous content of hormones was analyzed at six ripening stages of tomatoes development (as described in

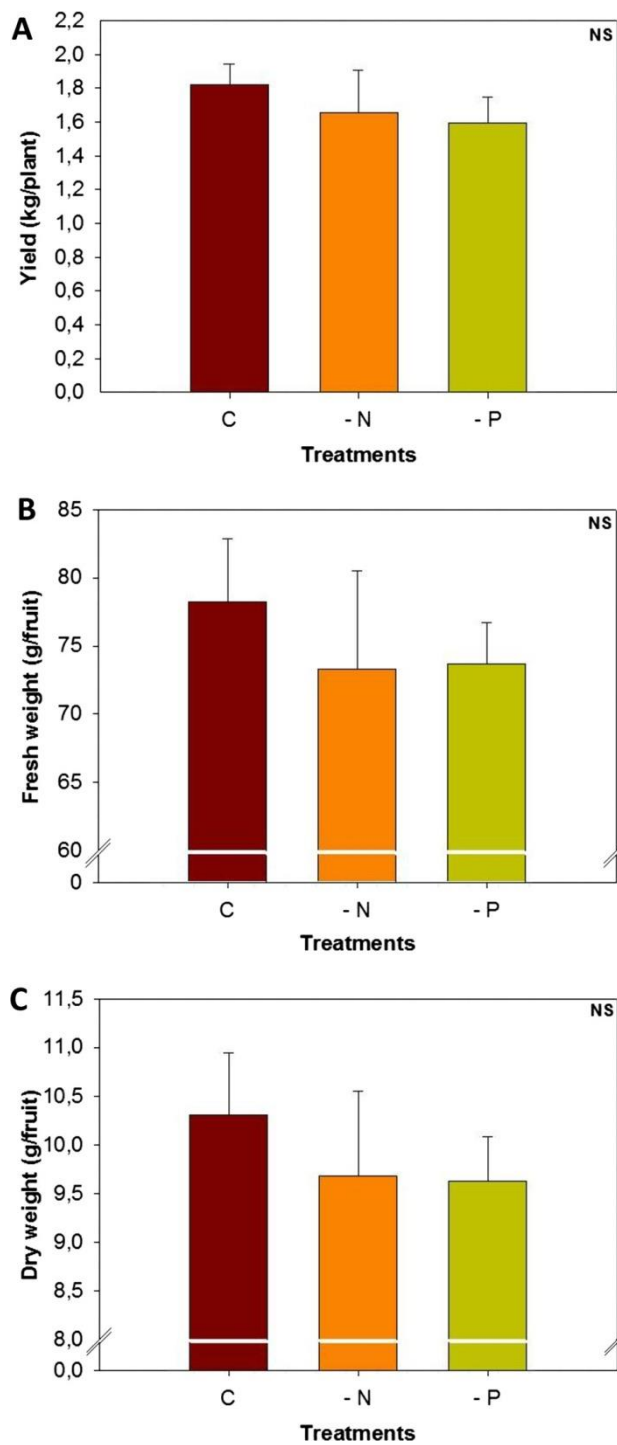


Fig. 2 Yield of greenhouse-grown tomato plants grown in the greenhouse subject to changes in nutrient availability (see materials and methods for details). **a** Yield; **b** Fruit fresh weight; **c** Fruit dry weight. For yield estimation, data represent the mean \pm standard error of $n=6$ plants, with all fruits being analyzed from each plant. For fresh and dry weights, data represent the mean \pm standard error of $n=6$ plants, with six fruits being analyzed for each plant. Differences between treatments were analyzed using a one-way ANOVA with Tukey post hoc tests. *NS* not significant (color figure online)

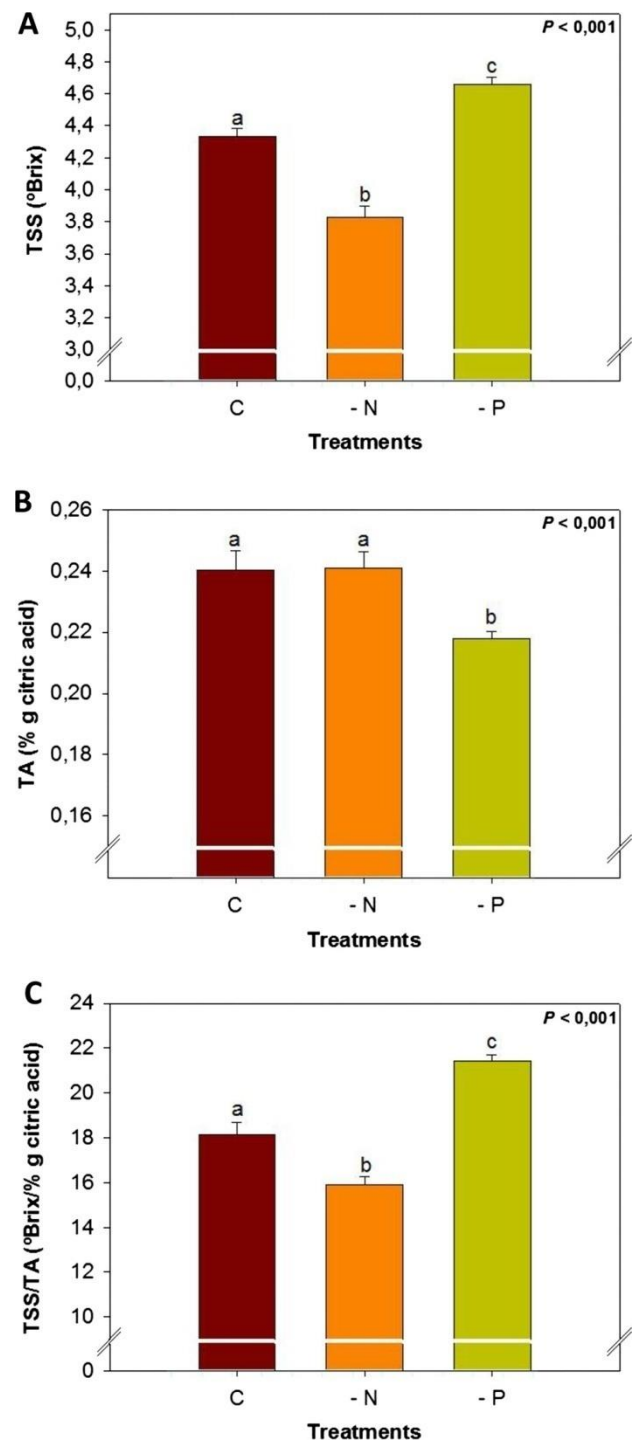


Fig. 3 Fruit quality of greenhouse-grown tomato plants grown in the greenhouse subject to changes in nutrient availability (see materials and methods for details). **a** Total soluble sugars; **b** Titratable acidity; **c** Total soluble sugars/ titratable acidity ratio. Data represent the mean \pm standard error of $n=6$ plants, with six fruits being analyzed for each plant. Differences between treatments were analyzed using a one-way ANOVA with Tukey post hoc tests. Different letters show significant differences between treatments (color figure online)

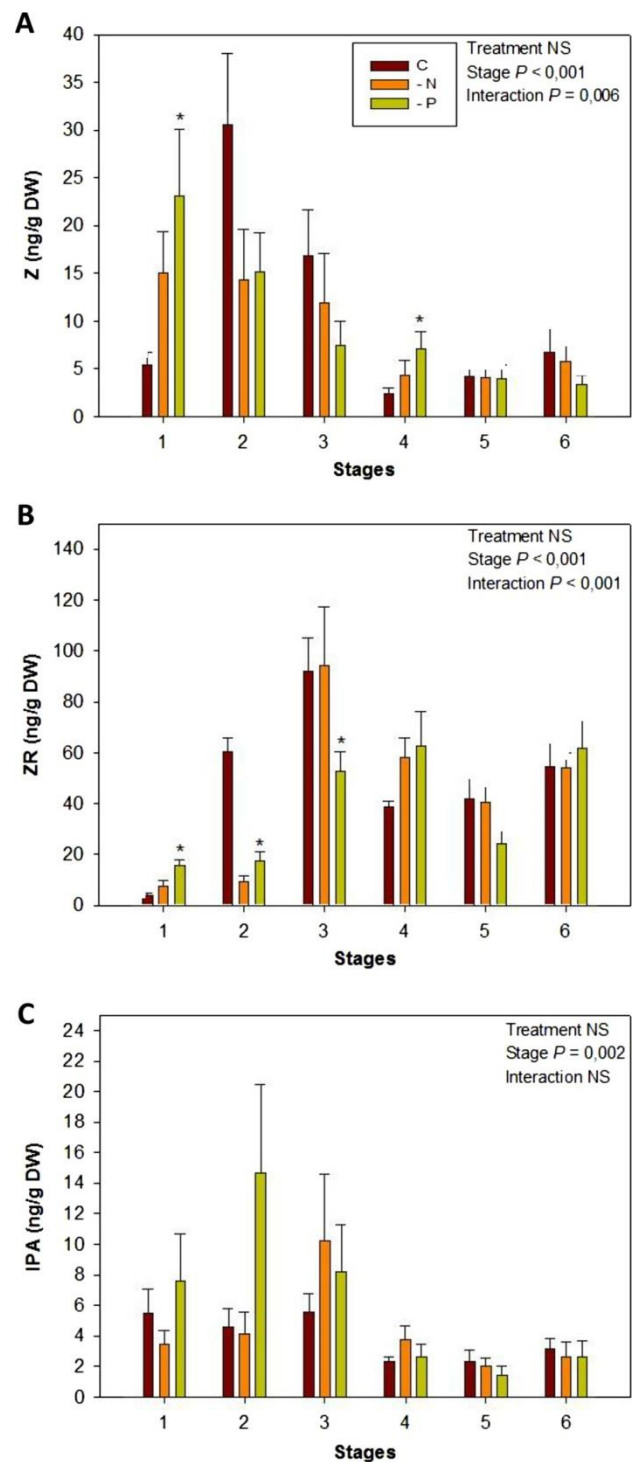
Fig. 4 Variations in the endogenous contents of **a** the bioactive cytokinin *trans*-zeatin (*Z*), **b** its immediate precursor *trans*-zeatin riboside (*ZR*) and **c** isopentenyl adenosine (*IPA*) during tomato fruit development in plants subject to changes in nutrient availability (see materials and methods for details). A description of fruit developmental stages is shown in Fig. 1. Data represent the mean \pm standard error of $n=6$ plants, with one fruit being analyzed for each plant. Differences between treatments and stages were analyzed using a two-way ANOVA. When differences between treatments or the interaction was significant, a Student's *t*-test was applied to examine differences between any given treatment and the control. Results of ANOVA (with *P* values) are shown in the inlets, while results of Student's *t*-tests (when $P \leq 0.05$) are shown by an asterisk. *NS* not significant (color figure online)

Fig. 1) for each treatment, to evaluate the differences in the hormonal regulation of the ripening process depending on the availability of N and P. Results showed that P availability has a major impact on the hormonal regulation of tomato ripening, not only during the first fruit developmental stages (stages I and II) but also during color break (stage IV).

The contents of the bioactive cytokinin, *trans*-zeatin (*Z*) increased significantly under reduced P availability compared to controls not only at early stages of development (stage I) but also during color break (at stage IV, Fig. 4a). Interestingly, while *trans*-zeatin riboside (*ZR*) content was higher in fruits with reduced P availability than those of control plants at stage I, this trend reversed at stages II and III, so that developing fruits at these stages in plants with reduced P availability showed lower *ZR* contents than controls (Fig. 4b). Treatment-related changes in *ZR*, the immediate precursor of *Z* contents, disappeared at later stages of fruit development. Furthermore, contents of isopentenyl adenosine (*IPA*) were not significantly modified by nutrient availability in any ripening stage (Fig. 4c). Despite reduced N availability negatively impacted on TSS content (Fig. 3a), the endogenous contents of cytokinins in maturing fruits were not influenced by a deficiency in N.

Aside from nutrient treatment effects on cytokinin contents, the impact of reduced P availability was observed in the contents of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (*ACC*, the immediate precursor of ethylene), salicylic acid (*SA*) and jasmonic acid (*JA*), while *ABA* content was not significantly affected (Fig. 5). While *SA* content increased at stage I, contents of *SA*, *JA* and *ACC* increased at stage II under reduced P availability compared to controls. The endogenous contents of *ACC*, *SA*, *ABA* and *JA* in maturing fruits were not influenced by a deficiency in N.

The contents of the auxin indole-3-acetic acid (*IAA*), melatonin (*MEL*) and gibberellin 4 (*GA*₄) were not influenced by N and P availability (Fig. 6). Interestingly, *MEL*



accumulated at relative high levels in tomato fruits attaining maximum values at initial stages of ripening and decreasing later during development. Despite these decreases, *MEL* contents ranged between 0.4 and 0.6 mg/g DW in ripen

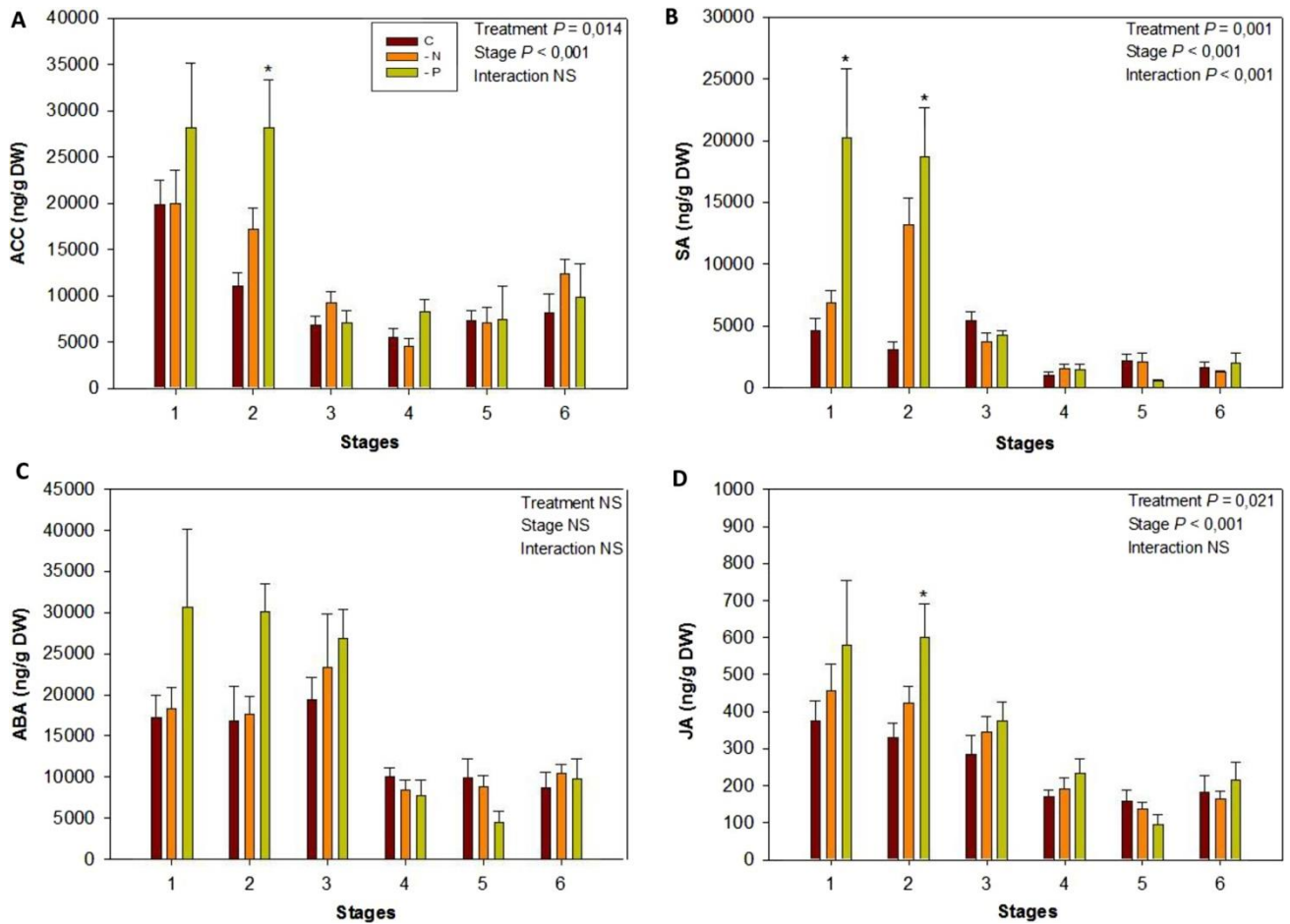


Fig. 5 Variations in the endogenous contents of **a** the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (the immediate ethylene precursor), **b** salicylic acid (SA), **c** abscisic acid (ABA), and **d** jasmonic acid (JA) during tomato fruit development in plants subject to changes in nutrient availability (see materials and methods for details). A description of fruit developmental stages is shown in Fig. 1. Data represent the mean \pm standard error of $n=6$ plants, with one fruit being analyzed

for each plant. Differences between treatments and stages were analyzed using a two-way ANOVA. When differences between treatments or the interaction was significant, a Student's *t*-test was applied to examine differences between any given treatment and the control. Results of ANOVA (with *P* values) are shown in the insets, while results of Student's *t*-tests (when $P \leq 0.05$) are shown by an asterisk. *NS* not significant (color figure online)

tomato fruits at harvest, showing no significant differences between treatments (Fig. 6).

Discussion

A proper nutrient management is essential to optimize growth and production in the cultivation of tomato plants. Although the effect of nutrient deficiencies on yield has been extensively studied in several tomato varieties, their influence of fruit quality is still not fully understood. Of special interest is the case of P, an element of phosphate, which strengthens roots and helps them to mature early, so that P availability is essential for plant growth and for attaining optimal tomato yields. Rock phosphate is recommended in organic farming as a source of P for plants since is more

environmentally friendly than inorganic phosphate (Zapata and Roy 2004). On the one hand, results of the present study have shown that insoluble P from soft ground rock phosphate can be used for the growth of tomato plants to improve fruit quality without negatively impacting on yield, an effect that may be associated with changes in the endogenous contents of hormones in developing fruits. On the other hand, it is also shown that N deficiency negatively impacts on fruit quality by reducing the sugar content of fruits.

When the availability of soluble P was reduced in Mey-ity, an increase in TSS together with a reduction in TA were observed, which resulted in an increase in the TSS/TA ratio. This improvement in fruit quality was achieved without negatively impacting fruit yield. A similar effect was observed by another study that reported that decreasing inorganic P availability in tomato plants increased TSS in fruits (Fandi

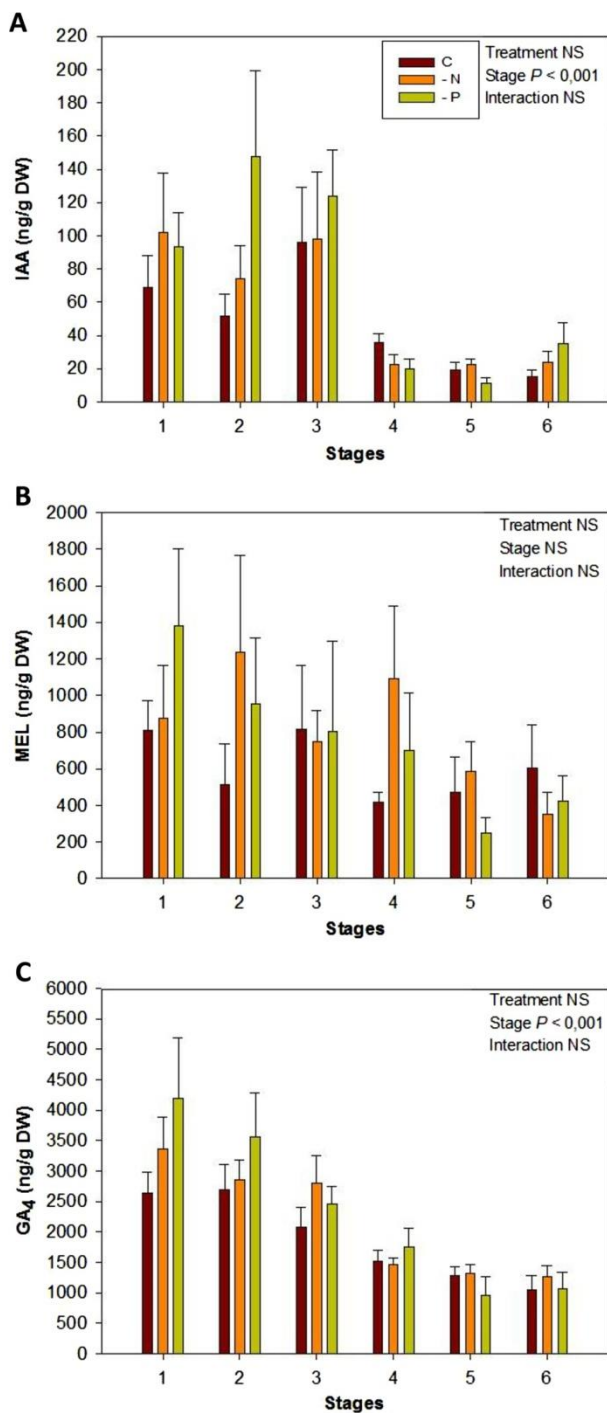


Fig. 6 Variations in the endogenous contents of **a** the auxin indole-3-acetic acid (IAA), **b** melatonin (MEL) and **c** the bioactive gibberellin GA₄ during tomato fruit development in plants subject to changes in nutrient availability (see materials and methods for details). A description of fruit developmental stages is shown in Fig. 1. Data represent the mean \pm standard error of $n = 6$ plants, with one fruit being analyzed for each plant. Differences between treatments and stages were analyzed using a two-way ANOVA. When differences between treatments or the interaction was significant, a Student's *t*-test was applied to examine differences between any given treatment and the control. Results of ANOVA (with *P* values) are shown in the inlets, while results of Student's *t*-tests (when $P \leq 0.05$) are shown by an asterisk. *NS* not significant (color figure online)

et al. 2010). Moreover, Sung et al. (2015) observed that there are also changes in sugars in xylem sap of tomato plants under P deficiency. Contrarily, two experiments reported that changes in P availability did not significantly vary soluble sugars or acidity of tomatoes (Abu-Alrub et al. 2019; Liu et al. 2011). Importantly, none of these previous studies used insoluble P from soft ground rock phosphate, so our results show for the first time to our knowledge that this agricultural practice can be used for organic cultivation of tomatoes to achieve tomatoes with higher sugar contents while yield is not negatively impacted. The present study opens new avenues for a more sustainable production of greenhouse tomatoes, but further research will be needed to prove the significance of these results in other tomato varieties cultivated using other agricultural practices. In contrast, reduced N availability results in lower sugar contents in the fruit, thus indicating that the deficiency of this nutrient must be prevented to achieve an optimal fruit quality and yield.

Interestingly, the improvement in fruit quality in tomato plants treated with insoluble P from soft ground rock phosphate seemed to be mediated by changes in the endogenous contents of hormones in developing fruits. Enhanced TSS and TSS/TA ratio together with reduced TA in fruits under low P availability might be explained by significant changes in the endogenous contents of hormones in developing fruits, particularly by an increase in the content of bioactive cytokinin *trans*-zeatin at early stages of development (stage I) and during color break (stage IV), which might be associated with an increased sink activity (Roitsch and Ehneß 2000). While *trans*-zeatin riboside content increased in developing fruits at stage I, it decreased at stages II and III compared to the control plants, thus suggesting a transient downregulation of the enzymatic release of the riboside moiety of the cytokinin (conversion of *trans*-zeatin riboside to *trans*-zeatin) at these stages, while *trans*-zeatin production increased again during color break in tomatoes. Aside from a prominent role in the regulation of sink strength by upregulating apoplastic investases, cytokinins are phytohormones implied in cell division acting as the main regulators of cell cycle progression (Schaller et al. 2014). Also, cytokinins have been related with abiotic stress response (Sharma et al. 2019). In this sense, Keshishian et al. (2018) reported that salt stress in tomato seedlings caused as well as an increase in endogenous cytokinin content. In our study, enhanced Z contents under low P availability paralleled an increase in tomato quality, which fits well with the role of cytokinins in increasing sugar contents and could alleviate the potential negative effects of low P availability on growth.

Furthermore, enhanced contents of bioactive cytokinin coincided with increased JA, SA and ACC (the ethylene precursor) concentrations at early stages of development, thus suggesting a complex hormonal crosstalk induced by low P availability. While ACC and JA increased at stage II, SA

increased at stages I and II. SA is a phytohormone that has been associated to stress tolerance. Its role in tolerance to biotic stress is well established (Raskin 1992). Furthermore, there is increasing evidence of its relationship with tolerance to abiotic stress. For example, Senaratna et al. (2000) demonstrated that application of exogenous SA protected tomato and bean plants against stress due to drought or temperature (cold and heat). Moreover, Wasti et al. (2012) reported that adverse effects of salt stress in tomato plants were alleviated by exogenous application of SA. Also, the study of Guo et al. (2018) indicated that exogenous application of SA could alleviate Cd toxicity in tomato plants. In this regard, it has been shown a signaling role for SA triggering a cascade of events that would confer tolerance to abiotic stress (Shakirova 2007). Furthermore, the application of exogenous SA in tomato increases soluble sugars in leaves (Javaheri et al. 2012), an effect that is thought to be mediated by an increase in ABA (Klessig and Malamy 1994). In our study, developing fruits of plants exposed to low P availability seemed therefore to trigger a defense response mediated by enhanced SA contents, which could play a dual role: (i) a role in protecting fruits from biotic and abiotic stress (associated with low P availability), and (ii) help cytokinins in promoting sink strength and therefore sugar accumulation at early stages of development.

Moreover, ACC and JA contents increased significantly at stage II of fruit ripening in plants with low P availability compared with control plants. ACC is the immediate precursor of ethylene, which plays an important role in growth, development, and responses of plants to biotic and abiotic stresses, as well as in the ripening of climacteric fruits, such as tomatoes (Poel and Straeten 2014). JA may also be involved in the ripening of climacteric fruits and has a prominent role in biotic stress tolerance (Fan et al. 1998; Santino et al. 2013). The increase in ACC and JA contents observed in our study suggest that they may be more associated with a stress response, characterized by a higher accumulation of sugars at early stages of fruit development mediated by an hormonal crosstalk together with salicylic acid and cytokinins, than with changes in ripening, as differences in ACC and JA were only observed at stage I and not later in development.

On the other hand, a reduction in N availability in tomato crop caused a decrease in soluble sugars (Fig. 3a), which led to a reduction in the TSS/TA ratio (Fig. 3c). These results are in agreement with those of Hernández et al. (2020) and Ya-dan et al. (2017), who observed a decrease in soluble sugars in tomato plants with a lower dose of N availability. However, this reduction in quality seems to be caused through a mechanism independent from hormones, at least those measured in our study, since the content of hormones analyzed in the present study did

not reveal any significant changes between plants with reduced N supply and control plants. It should be noted, however, that in some cases hormonal signaling can be affected without alterations in endogenous hormone contents; therefore, the possible link between N deficiency, hormonal (e.g., cytokinin) signaling and reduced sugar accumulation in fruits requires further investigation.

Conclusions

In conclusion, results show that a reduction of P may be used to increase tomato fruit sugar contents and modulate fruit quality while yield being not negatively impacted on tomatoes of the variety Meyity. These results may have important implications to reduce the depletion of natural P reserves to arrive at a more sustainable horticulture in the current frame of global change. The availability of nutrients during fruit growth and development (including ripening) has an important impact on fruit quality, and a better understanding of the nutrient requirement in tomato plants may be very helpful to improve crop yield and fruit quality, while reducing the impact of current agricultural practices in the environment. Reducing the availability of soluble P is therefore recommended for a more sustainable agriculture in the cultivation of tomato plants of the variety Meyity. Furthermore, it was shown here that several hormones may be involved in the modulation of fruit quality. Aside from cytokinins, which appeared to have the more prominent role in the increased accumulation of sugar contents observed in fruits of plants exposed to low P; SA, JA, ACC might also help plants to withstand stress and compensate for potential yield losses. Indeed, the hormonal response observed here in tomato fruits may simply reflect a defense response triggered by low P availability to ensure fruit and seed production by the plant. Moreover, according to the results obtained in tomato plants exposed to N deficiency, it may be concluded that the availability of N should be tightly controlled in tomato cultivation to prevent a reduction in the quality of tomatoes, here reflected by a reduction of sugar content in the fruit.

Author Contributions SMB was the supervisor of this project, planning all stages of this research. MN conducted the experiments, collected and interpreted the data, and wrote a first draft of the manuscript. SMB contributed to interpretation of the data and wrote the final version of the manuscript.

Funding Funding was provided by Generalitat de Catalunya (Grant No. 2017 SGR 980 and ICREA Academia award to S.M.-B. and Doctorat Industrial to M.N.).

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Abu-Alrub I, Saleh S, Awaga AA (2019) Effect of different rates of nitrogen and phosphorus fertilizers on yield and quality of greenhouse tomato under the UAE condition. *EC Agriculture* 5:139–146
- Adams P (1986) Mineral Nutrition. In: Atherton JG, Rudich J (eds) *The Tomato Crop*. Chapman and Hall Publishes, New York, pp 281–324
- Amtmann A, Armengaud P (2009) Effects of N, P, K and S on metabolism: New knowledge gained from multi-level analysis. *Curr Opin Plant Biol* 12:275–283. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.04.014>
- Bénard C, Gautier H, Bourgaud F, Grasselly D, Navez B, Caris-Veyrat C, Weiss M, Génard M (2009) Effects of low nitrogen supply on tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit yield and quality with special emphasis on sugars, acids, ascorbate, carotenoids, and phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 57:4112–4123. <https://doi.org/10.1021/jf8036374>
- De Pablo J, Battistuzzi MAG (2012) Analytical model for the global consumption of tomatoes- The Spanish case. *Afri J Agric Res* 7:1228–1235
- Erba D, Casiraghi MC, Ribas-Agustí A, Cáceres R, Marfà O, Castellari M (2013) Nutritional value of tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) grown in greenhouse by different agronomic techniques. *J Food Comp Anal* 31:245–251. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.05.014>
- Fan X, Mattheis JP, Fellman JL (1998) A role for jasmonates in climacteric fruit ripening. *Planta* 204:444–449
- Fandi M, Muhtaseb J, Hussein M (2010) Effect of N, P, K concentration on yield and fruit quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* L) in tuff culture. *J Cent Eur Agric* 11:179–184
- Guo J, Zhou R, Ren X, Jia H, Hua L, Xu H, Lv X, Zhao J, Wei T (2018) Effects of salicylic acid, epi-brassinolide and calcium on stress alleviation and Cd accumulation in tomato plants. *Ecotoxicol Environ Safety* 157:491–496. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.010>
- Hernández V, Hellín P, Fenoll J, Flores P (2020) Impact of nitrogen supply limitation on tomato fruit composition. *Sci Hort* 264:109–173. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109173>
- Hoagland DR, Arnon DI (1938) The water-culture method for growing plants without soil. *Univ Calif Agric Exp Station Circ* 34:1–39
- Javaheri M, Mashayekhi K, Dadkhah A, Tavallaee FZ (2012) Effects of salicylic acid on yield and quality characters of tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Int J Agric Crop Sci* 4:1184–1187
- Keshishian EA, Hallmark HT, Ramaraj T, Plačková L, Sundararajan A, Schilkey F, Novák O, Rashotte AM (2018) Salt and oxidative stresses uniquely regulate tomato cytokinin levels and transcriptional response. *Plant Direct* 2:1–13
- Klessig DF, Malamy J (1994) The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol Biol* 26:1439–1458. <https://doi.org/10.1007/BF00016484>
- Latimer G (2016) *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 20th edn. Rockville, MD, USA
- Liu K, Zhang TQ, Tan CS, Astatkie T (2011) Responses of fruit yield and quality of processing tomato to drip-irrigation and fertilizers phosphorus and potassium. *Agron J* 103:1339–1345. <https://doi.org/10.2134/agronj2011.0111>
- Maathuis FJM (2009) Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr Opin Plant Biol* 12:250–258. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.04.003>
- Müller M, Munné-Bosch S (2011) Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Methods* 7:37. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-37>
- Poel BV, Straeten DV (2014) 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene! *Front Plant Sci* 5:640. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00640>
- Raskin I (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43:439–463. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.002255>
- Roitsch T, Ehneß R (2000) Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regul* 32:359–367
- Santino A, Taurino M, De Domenico S, Bonsegna S, Poltronieri P, Pastor V, Flors V (2013) Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a)biotic stresses. *Plant Cell Rep* 32:1085–1098
- Schaller GE, Street IH, Kieber JJ (2014) Cytokinin and the cell cycle. *Curr Opin Plant Biol* 21:7–15. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.05.015>
- Senaratna T, Touchell D, Bunn E, Dixon K (2000) Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regul* 30:157–161. <https://doi.org/10.1023/A:1006386800974>
- Shakirova FM (2007) Role of hormonal system in the manifestation of growth promoting and anti-stress action of salicylic acid. In: Hayat S, Ahmad A (eds) *Salicylic Acid A Plant Hormone*. Springer, Dordrecht Netherlands
- Sharma A, Shahzad B, Kumar V, Kohli SK, Sidhu GPS, Bali AS, Handa N, Kapoor D, Bhardwaj R, Zheng B (2019) Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. *Biomolecules* 9:285. <https://doi.org/10.3390/biom9070285>
- Sung J, Sonn Y, Lee Y, Kang S, Ha S, Krishnan HB, OhTK (2015) Compositional changes of selected amino acids, organic acids, and soluble sugars in the xylem sap of N, P, or K-deficient tomato plants. *J Plant Nutr Soil Sci* 178:792–797. <https://doi.org/10.1002/jpln.201500071>
- Takizawa A, Hyodo H, Wada K, Ishii T, Satoh S, Iwai H (2014) Regulatory specialization of xyloglucan (XG) and glucuronarabinoxylan (GAX) in pericarp cell walls during fruit ripening in tomato (*Solanum lycopersicum*). *PLoS ONE* 9:2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089871>
- Truffault V, Ristorto M, Brajeul E, Vercambre G, Gautier H (2019) To stop nitrogen overdose in soilless tomato crop: A way to promote fruit quality without affecting fruit yield. *Agronomy* 9:80. <https://doi.org/10.3390/agronomy9020080>
- Wasti S, Mimouni H, Smiti S, Zid E, Ahmed HB (2012) Enhanced salt tolerance of tomatoes by exogenous salicylic acid applied through rooting medium. *OMICS* 16:200–207. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0071>
- Wei Z, Du T, Li X, Fang L, Liu F (2018) Interactive effects of elevated CO₂ and N fertilization on yield and quality of tomato grown under reduced irrigation regimes. *Front Plant Sci* 9:328. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00328>
- Ya-dan D, Hong-xia C, Shi-quan L, Xiao-bo G, Yu-xin C (2017) Response of yield, quality, water and nitrogen use efficiency of tomato to different levels of water and nitrogen under drip irrigation in Northwestern China. *J Integr Agric* 16:1153–1161. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61371-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61371-0)
- Zapata F, Roy RN (2004) Use of phosphate rocks for sustainable agriculture. In: Roy RN (ed) *Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome Italy

Zhu Q, Ozores-Hampton M, Li Y, Morgan K, Liu G, Mylavarapu RS (2017) Effect of phosphorus rates on growth, yield, and postharvest quality of tomato in a calcareous soil. *HortScience* 52:1406–1412. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI12192-17>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.