



Saltillo, Coahuila a 18 de diciembre de 2018

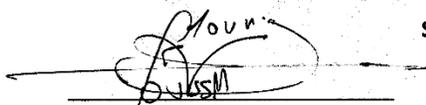
Programa de Maestría en Ciencias en Agroplasticultura

Coordinación de Posgrado

PRESENTE

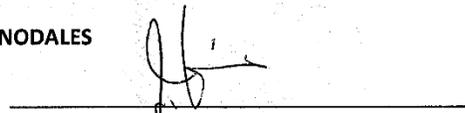
Por este conducto nos permitimos informar a esta coordinación que, el documento de tesis preparado por ELIZABETH SÁNCHEZ ZACATECO titulado "Efecto del Nanofertilizante de Fósforo Encapsulado con Almidón en el Crecimiento de las Plantas de Tomate (*Solanum lycopersicum*) Colonizadas por *Bacillus subtilis*" el cual fue presentado el día 18 de diciembre de 2018, ha sido modificado de acuerdo a las observaciones, comentarios y sugerencias, realizadas por el Comité Evaluador asignado. Por tal motivo, avalamos que el documento corresponde a la versión final del documento de tesis.

Atentamente,

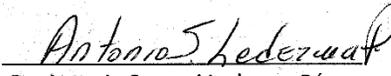


Dr. Oussama Mounzer
Presidente

SINODALES

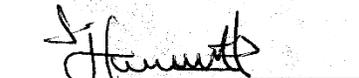


Dr. Marco Antonio Castillo Campohermoso
Secretario



Dr. Antonio Serguei Ledezma Pérez
Vocal

Vo. Bo. De los Asesores



Dr. José Humberto Valenzuela Soto



Dr. Randy Ortiz Castro

TESIS CON CARACTER ABIERTO

PROGRAMA: MAESTRÍA EN CIENCIAS EN AGROPLASTICULTURA

AUTOR: ELIZABETH SÁNCHEZ ZACATECO FIRMA 

TITULO: Efecto del Nanofertilizante de Fósforo Encapsulado con Almidón en el Crecimiento de las Plantas de Tomate (Solanum lycopersicum) Colonizadas por Bacillus subtilis.

ASESORES: Dr. José Humberto Valenzuela Soto FIRMA 

Dr. Randy Ortiz Castro

FIRMA 

El Centro de Investigación en Química Aplicada clasifica el presente documento de tesis como ABIERTO.

Un documento clasificado como Abierto se expone en los estantes del Centro de Información para su consulta. Dicho documento no puede ser copiado en ninguna modalidad sin autorización por escrito del Titular del Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coahuila, a 18 de Diciembre de 2018



Sello de la Institución



Dr. Oliverio Santiago Rodríguez Fernández
Director General del CIQA



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Ciencias en Agroplasticultura

TESIS

**Efecto del Nanofertilizante de Fósforo Encapsulado con Almidón en el
Crecimiento de las Plantas de Tomate (*Solanum lycopersicum*)
Colonizadas por *Bacillus subtilis***

Presentada por:

ELIZABETH SÁNCHEZ ZACATECO

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencia en Agroplasticultura

Asesorada por:

**Dr. José Humberto Valenzuela Soto
Dr. Randy Ortiz Castro**

Saltillo, Coahuila

Diciembre, 2018

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Ciencias en Agroplasticultura

TESIS

**Efecto del Nanofertilizante de Fósforo Encapsulado con Almidón en el
Crecimiento de las Plantas de Tomate (*Solanum lycopersicum*)
Colonizadas por *Bacillus subtilis***

Presentada por:

ELIZABETH SÁNCHEZ ZACATECO

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Agroplasticultura

Asesorada por:

**Dr. José Humberto Valenzuela Soto
Dr. Randy Ortiz Castro**

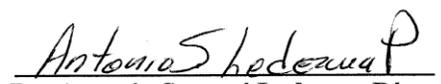
SINODALES



Dr. Oussama Mounzer
Presidente



Dr. Marco Antonio Castillo Campohermoso
Secretario



Dr. Antonio Serguei Ledezma Pérez
Vocal

Saltillo, Coahuila

Diciembre, 2018

DECLARACIÓN

Declaro que la información contenida en la Parte Experimental así como en la Parte de Resultados y Discusiones de este documento y que forman parte de las actividades de investigación y desarrollo realizadas durante el período que se me asignó para llevar a cabo mi trabajo de tesis, será propiedad del Centro de Investigación en Química Aplicada.

Saltillo, Coahuila a 18 de diciembre de 2018

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Elizabeth Sánchez Zacateco', with a small asterisk above the 'S' and another below the 'C'.

ELIZABETH SÁNCHEZ ZACATECO

Nombre y Firma



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA

PROGRAMA DE POSGRADO EN AGROPLASTICULTURA

EFFECTO DEL NANOFERTILIZANTE DE FÓSFORO ENCAPSULADO CON
ALMIDÓN EN EL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS DE TOMATE (*Solanum
lycopersicum*) COLONIZADAS POR *Bacillus subtilis*.

TESIS

Presentada por:

ELIZABETH SANCHEZ ZACATECO

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN AGROPLASTICULTURA

DIRECTORES

Dr. José Humberto Valenzuela Soto

Dr. Randy Ortiz Castro

Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre 2018

AGRADECIMIENTOS

A DIOS Y A LA VIRGEN DE GUADALUPE: a dios gracias por darme la vida, salud y sabiduría. Gracias a la virgen de Guadalupe por darme una segunda oportunidad de vida.

A CONACYT: Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), que apoyó este proyecto mediante la Convocatoria de Proyectos de Desarrollo Científico para Atender Problemas Nacionales 2014, a través del Proyecto No. 248760 y por otorgarme la beca, que fue muy indispensable para terminar mi maestría.

A CIQA: al Centro de Investigación en Química Aplicada que fue como mi segundo hogar, gracias a sus instalaciones y equipos se pudo concluir el trabajo de investigación.

A MIS ASESORES: gracias a ustedes Dr. José Humberto Valenzuela Soto del CIQA y Dr. Randy Ortiz Castro del INECOL, con su apoyo en la escritura y experimento se pudo cumplir con los objetivos planteados.

Y A MIS SINODALES: gracias a sus observaciones y sugerencias para mejorar el documento, gracias por el tiempo dedicado a este trabajo de investigación.

DEDICATORIA

A MIS PADRES: gracias a mi papá Aniceto Sánchez Sánchez y a mi mamá Silvana Zacateco Sánchez, con sus palabras y amor pude concluir la maestría, gracias por siempre estar a mi lado y apoyarme en todo momento, los amo mucho.

HERMANOS: con sus locuras me hacen los días más alegres y sus palabras de ánimos me ayudaron mucho durante mi formación, los amo hermanos Bernardo, Enrique, Hugo, Aniceto y hermana Ros.

SOBRINOS: con ustedes soy la tía más feliz, los quiero mucho Janith, Bladimir, Lupita, Natalia y a mi niña hermosa María José.

AMIGOS: aquellos amigos que conocí durante la maestría Yvette, Miriam, Edgar, Alfredo y Andrés. A mis amigos externos: Mariana, Axel, Sujey, Eva, Fernando, Angélica y Salvador Salome De Jesús. Sus palabras de ánimos fueron fundamentales para mí.

A mi segunda familia que me han brindado momentos inolvidables y me refiero a Anita, Mari Luz y Francisco.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
II.1. Cultivo de tomate en México.....	4
II. 2. Producción agrícola en la actualidad.	4
II.3. Problemas ambientales por el uso de fertilizantes.....	5
II. 4. La nanotecnología.....	7
II. 5. Ventajas del uso de la nanotecnología.....	8
II. 6. La nanotecnología en México.....	8
II. 7. Nanotecnología en el sector agrícola.....	9
II. 8. Nanofertilizantes encapsulados.....	10
II. 9. Matrices de encapsulamiento y su efecto en la liberación lenta.....	14
II. 10. Situación actual del fósforo y su importancia en la agricultura.....	14
II. 11. Fósforo en el suelo.....	15
II.12. Movilidad del fósforo.....	16
II.13. Influencia de las bacterias en la disponibilidad de nutriente.....	17
II.14. Biomasa microbiana.....	18
II.15. Liberación de moléculas de las bacterias en el suelo.....	21
II.16. Generalidades del <i>Bacillus subtilis</i>	21
II.17. Colonias típicas de <i>Bacillus subtilis</i>	22
II.18. <i>Bacillus subtilis</i> cepa LPM1.....	23
III. HIPÓTESIS.....	24
IV. OBJETIVO GENERAL.....	24
IV. 1. Objetivos específicos.....	24
V. MATERIALES Y METODOS.....	25
V. 1. Localización del sitio experimental.....	25
V. 2. Nanofertilizante de fósforo encapsulado con almidón.....	25
V. 3. Condiciones de crecimiento para la cepa promotora de crecimiento <i>Bacillus subtilis</i> LPM1.....	26
V. 4. Preparación del sustrato para la siembra de las plantas de tomate.....	26

V. 5. Aplicación de tratamientos y diseño experimental.....	28
V. 6. Colonización del microorganismo a 3 intervalos de tiempo.....	31
V. 7. Cuantificación del contenido total de fósforo en tejido foliar y radicular.....	33
V. 8. Promoción del crecimiento vegetal.....	33
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
VI. 1. Bioensayo realizado en otoño del 2017.....	34
VI. 2. Bioensayo realizado en primavera-verano del 2018.....	44
VI. 2. 1. Número de hojas.....	46
VI. 2. 2. Altura de las plantas.....	47
VI. 2. 3. Área foliar.....	48
VI. 2. 4. Diámetro del tallo.....	49
VI. 3. Variables de crecimiento vegetal que corresponden a la biomasa fresca.....	51
VI. 3. 1. Peso fresco de la hoja.....	51
VI. 3. 2. Peso fresco de la raíz.....	52
VI. 3. 3. Peso fresco del tallo.....	53
VI. 3. 4. Peso fresco total.....	54
VI. 4. Variables de crecimiento vegetal que corresponden a la biomasa seca.....	55
VI. 4. 1. Peso seco de la hoja.....	55
VI. 4. 2. Peso seco de la raíz.....	56
VI. 4. 3. Peso seco del tallo.....	57
VI. 4. 4. Peso seco total.....	58
VI. 5. Contenido de macronutrientes N, P y K en el tejido foliar y radical de las plantas de tomate.....	59
VI. 5. 1. Nitrógeno en el tejido foliar.....	59
VI. 5. 2. Fósforo en el tejido foliar.....	60
VI. 5. 3. Potasio en el tejido foliar.....	61
VI. 5. 4. Nitrógeno en el tejido radicular.....	62
VI. 5. 5. Fósforo en el tejido radicular.....	63

VI. 5. 6. Potasio en el tejido radicular.....	64
VI. 6. Parámetros fisiológicos que corresponden fotosíntesis, conductancia estomática y transpiración.....	65
VI. 7. Evaluación de la colonización de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> en raíces de plantas de tomate.....	66
VII. CONCLUSIONES.....	71
VIII. PERSPECTIVAS.....	72
IX. LITERATURA CITADA.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nutrientes incorporados en la solución nutritiva Steiner.....	28
Tabla 2. Variables de crecimiento del cultivo de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) tratadas con nanofertilizante de fósforo encapsulado con almidón, MKP libre, con almidón solo y colonizadas por <i>B. subtilis</i>	37
Tabla 3. Variables de crecimiento del cultivo de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) tratadas con nanofertilizante de fósforo encapsulado con almidón, MKP libre, con almidón solo y colonizadas por <i>B. subtilis</i>	42
Tabla 4. UFC/g encontradas en las raíces de las plantas de tomate antes de aplicar los tratamientos de MKP libre y encapsulado.....	67
Tabla 5. UFC/g encontradas en las raíces de las plantas de tomate tratadas con MKP libre y el encapsulado en los tres muestreos.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Ilustración de un fertilizante de urea encapsulado con diferentes matrices de polímeros y su forma de liberación de acuerdo al biopolímero. Imagen modificada de Qiao *et al.* (2016).....13
- Figura 2.** Características morfológicas de las colonias de la bacteria *Bacillus subtilis*: A) Diseño fractal de las colonias *B. subtilis*, B) Colonias de la bacteria *B. subtilis* en placas con agar. Imagen tomada de Fujikawa y Matsushita. (1989).....22
- Figura 3.** Localización del sitio experimental (fuente Google Earth). A) Vista general del CIQA. B) Área de invernaderos. C) Área principal de trabajo en el invernadero de mediana tecnología.....25
- Figura 4.** Morfología del nanofertilizante de fósforo encapsulado con almidón de maíz, la flecha indica el P encapsulado. Imagen obtenida mediante Microscopio electrónico de barrido modelo SM-510, marca TOPCON.....26
- Figura 5.** Aplicación de la bacteria *Bacillus subtilis* a una población de 1×10^8 UFC/ml sobre planta directamente en la charola.....27
- Figura 6.** Aplicación del encapsulado en la base del tallo de las plantas.....30
- Figura 7.** Diluciones seriadas y siembra de bacterias en placas con medio LB.....32
- Figura 8.** Detección de bacteria *Bacillus subtilis*: A) Crecimiento de bacterias obtenidas de la raíz. B) Obtención de colonias puras. C) Tinción Gram de las colonias puras.....32
- Figura 9.** Porcentaje de NPK en el tejido foliar de las plantas de tomate a los 15 DDT. Tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial y *B. subtilis*.....39
- Figura 10.** Porcentaje de NPK en el tejido foliar de las plantas de tomate a los 30 DDT tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial y *B. subtilis*.....44
- Figura 11.** Medición de parámetros fisiológicos: A) Fotosíntesis. B) Conductancia estomática y C) Transpiración en plantas de tomate tratadas con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, *B. subtilis* y almidón de maíz. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).....45
- Figura 12.** Número de hojas (NH) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, *B. subtilis* y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).....46

Figura 13. Altura de plantas (AP) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, <i>B. subtilis</i> y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).....	48
Figura 14. Área foliar (AF) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, <i>B. subtilis</i> y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).....	49
Figura 15. Diámetro del tallo (DT) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, <i>B. subtilis</i> y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).....	50
Figura 16. Peso fresco de la hoja (PFH) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, <i>B. subtilis</i> y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).....	52
Figura 17. Peso fresco de la raíz (PFR) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, <i>B. subtilis</i> y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).....	53
Figura 18. Peso fresco del tallo (PFT) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, <i>B. subtilis</i> y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).....	54
Figura 19. Peso fresco total (PFTot) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, <i>B. subtilis</i> y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).....	54
Figura 20. Peso seco de la hoja (PSH) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, <i>B. subtilis</i> y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).....	55
Figura 21. Peso seco de la raíz (PSR) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, <i>B. subtilis</i> y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).....	56
Figura 22. Peso seco del tallo (PST) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, <i>B. subtilis</i> y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).....	57

Figura 23. Peso seco total (PSTot) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, <i>B. subtilis</i> y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).....	58
Figura 24. Porcentaje de nitrógeno (N) en el tejido foliar de las plantas de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, <i>B. subtilis</i> y almidón de maíz sin tratar. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).....	59
Figura 25. Porcentaje de fósforo (P) en el tejido foliar de las plantas de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, <i>B. subtilis</i> y almidón de maíz sin tratar. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).....	60
Figura 26. Porcentaje de potasio (K) en el tejido foliar de las plantas de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, <i>B. subtilis</i> y almidón de maíz sin tratar. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).....	62
Figura 27. Porcentaje de nitrógeno (N) en el tejido radicular de las plantas de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, <i>B. subtilis</i> y almidón de maíz sin tratar. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).....	63
Figura 28. Porcentaje de fósforo (P) en el tejido radicular de las plantas de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, <i>B. subtilis</i> y almidón de maíz sin tratar. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).....	64
Figura 29. Porcentaje de potasio (K) en el tejido radicular de las plantas de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, <i>B. subtilis</i> y almidón de maíz sin tratar. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).....	64
Figura 30. Medición de parámetros fisiológicos: A) Fotosíntesis. C) Conductancia estomática y C) Transpiración en plantas de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, <i>B. subtilis</i> y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).....	66
Figura 31. Bacterias que corresponden a las plantas tratadas con MKP libre+ <i>B. subtilis</i> . A) Colonias puras y B) Tinción Gram.....	69
Figura 32. Bacterias que corresponden a las plantas tratadas con MKP libre sin inoculación. A) Colonias puras y B) Tinción Gram.....	69
Figura 33. Bacterias que corresponden a las plantas tratadas con el encapsulado + <i>B. subtilis</i> . A) Colonias puras y B) Tinción Gram.....	70

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) ubicado en la ciudad de Saltillo, Coahuila, México. El trabajo fue desarrollado en dos etapas, a nivel invernadero y a nivel laboratorio. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación del nanofertilizante de fósforo encapsulado con almidón sobre el crecimiento de plantas de tomate inoculadas con la cepa promotora de crecimiento vegetal *Bacillus subtilis* LPM1. Se realizaron dos bioensayos: en otoño 2017 y primavera-verano 2018, en el primer ensayo se trabajó con 5 tratamientos: 1) Plantas sin fósforo, 2) Plantas con fosfato monopotásico (MKP) libre + *Bacillus subtilis*, 3) Plantas con MKP libre, 4) Plantas con el nanoencapsulado de fósforo + *Bacillus subtilis* y 5) plantas con el nanoencapsulado, se realizaron con 12 repeticiones por tratamiento utilizando el diseño experimental de bloques completamente al azar con una $p \leq 0.05$. Para el segundo bioensayo se trabajó con los mismos tratamientos, aunque se incluyó un tratamiento con la matriz de almidón (sin procesar) bajo las mismas condiciones. Posteriormente, se evaluaron los parámetros de crecimiento de las plantas como: altura de las plantas (AP), número de hojas (NH), diámetro del tallo (DT), peso fresco y seco de las hojas, tallo, raíz, colonización de la raíz, así como, la medición de la fotosíntesis, conductancia estomática (CE) y transpiración. Plantas tratadas con el MKP libre + *B. subtilis*, encapsulado + *B. subtilis* e incluso las tratadas con el encapsulado sin bacterias mostraron tener mayor influencia en los parámetros evaluados en comparación a las plantas sin fósforo, así como, las tratadas con MKP libre. Sin embargo, en la fotosíntesis, CE y transpiración, los tratamientos tuvieron un comportamiento similar excepto en plantas sin fósforo. La bacteria *B. subtilis* fue detectada en las plantas inoculadas en ambos bioensayos. Por último, se concluye que las plantas tratadas con el nanofertilizante y MKP libre en combinación con las rizobacterias, tuvieron un efecto positivo en el desarrollo de las plantas. Por otro lado, no se afectó la colonización de la rizobacteria, ya que, se detectó la presencia de esta en las plantas inoculadas.

I. INTRODUCCIÓN

La gran diversidad de microorganismos en el suelo son la columna vertebral funcional de todos los ecosistemas terrestres (Eisenhauer, 2016). Cada vez más, la composición de los suelos se considera fundamental para el bienestar de los ecosistemas (Powell *et al.*, 2014). Las bacterias de vida libre o asociativa que forman la microbiota del suelo habitan en la rizósfera estimulando el crecimiento de las plantas. Los microorganismos más estudiados pertenecen a los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Loredo-Osti *et al.*, 2004). Estudios previos han mostrado que las bacterias son capaces de solubilizar algunos minerales como lo es el fósforo (P), dichas bacterias son utilizadas como biofertilizantes para el campo agrícola (Anzuay *et al.*, 2017).

El P, es un elemento muy importante para el desarrollo y crecimiento de las plantas (Rodríguez, 1998). Es considerado uno de los elementos menos disponibles, por lo que, el incremento de la producción de fertilizantes a base de P está ocasionando el agotamiento de las reservas del P a nivel mundial (Albuquerque y Velásquez, 2008).

Actualmente, numerosas investigaciones se han dirigido a la encapsulación de fertilizantes y la modificación en el tamaño a través del uso de la nanotecnología, que consiste en el procesamiento a nivel atómico de los elementos, teniendo en cuenta la producción de alimentos ecológicamente amigables, las aplicaciones de la nanotecnología son diversas en la agricultura y destaca la síntesis de nanofertilizantes (Sabir *et al.*, 2014). Se cree que, el uso de nanofertilizantes mejora el crecimiento y rendimiento de los cultivos, a través del uso eficiente del elemento por la reducción de pérdidas y minimiza el impacto ambiental (Liu y Lal, 2015). Dentro del material de recubrimiento se utilizan los biopolímeros como la lignina, celulosa y el almidón (Mulder *et al.*, 2011). Los polímeros tienen la capacidad de retener y absorber agua, por lo que se les atribuye una ventaja más en su uso como recubrimientos de fertilizantes (Zohuriaan-Mehr y Kabiri, 2008).

Estudios realizados han demostrado que la encapsulación de fertilizantes tiene una reducción de la velocidad de liberación, provocando una liberación lenta del elemento para mejorar la eficiencia de los fertilizantes (Qiao *et al.*, 2016). Se han registrado estudios donde la aplicación de nanopartículas (NPs) de óxido de Zinc (NPs ZnO) más 100 mM de P tuvieron un incremento en el crecimiento y la biomasa total por 130.6 y 131 % con respecto al testigo en el cultivo de algodón, así como, un incremento en el nivel de clorofila, carotenoides y proteínas solubles (Venkatachalam *et al.*, 2017). Un nuevo tipo de hidroxiapatita que suministra NPs de P en soya con un tamaño de 16 nm demostraron que incrementa la tasa de crecimiento y rendimiento de semillas de 33 y 20% (Liu y Lal, 2015). Se ha descrito que la aplicación de NPs de azufre a 200 ppm en aplicación foliar beneficia el crecimiento, calidad de frutos y la obtención de plantas sanas de tomate (Salem *et al.*, 2016). Por otra parte, estudios demuestran que la encapsulación de un fertilizante con polisulfona, la liberación en un tiempo estimado de 5 horas es de, 22.3 % de N, 22.3% de P y 6.88% de K (Tomaszewska y Jarosiewicz, 2006).

La encapsulación del P en algunas ocasiones no es suficiente para incrementar la captura del elemento en la planta, por lo que resulta necesario emplear otras alternativas en la agricultura para el aprovechamiento de nutrientes. Una alternativa es la incorporación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria), estas rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas son bacterias que se encuentran asociadas en las raíces, particularmente en el rizoplasma. Estos microorganismos constituyen una principal herramienta para la agricultura sostenible (Nakkeeran *et al.*, 2005). El uso de bacterias se les puede emplear para sustituir parcial o totalmente la fertilización sintética (Bojórquez *et al.*, 2010). Estudios revelan que el género *Bacillus sp.* presentan actividad fosfatasa, es decir, tienen la capacidad de solubilizar el P que se encuentra en el suelo, por lo que, incrementa significativamente la biomasa, crecimiento y rendimiento de las plantas de tomate (Sánchez López *et al.*, 2012).

Actualmente, la preocupación por el rápido agotamiento del recurso P ha generado la búsqueda de nuevas técnicas que mejoren el uso eficiente de este elemento. Dentro de las investigaciones se han encontrado bacterias que tienen la capacidad de liberar ácidos para solubilizar el P (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010). Sin embargo, también se ha hecho el uso de la nanotecnología para fabricar fertilizantes a escala nanométrica y diseñar su encapsulación para una liberación lenta y un uso más eficiente del elemento (Sabir *et al.*, 2014). Sin embargo, hasta el momento no existe información documentada sobre el efecto que se genera al incorporar nanofertilizantes de P encapsulado con almidón (como matriz) en plantas de tomate y/o colonizadas por *Bacillus subtilis*, por lo que, en este presente trabajo de investigación se busca generar información acerca de las respuestas fisiológicas de las plantas al combinar las dos alternativas para el aprovechamiento del P y hacer un uso eficiente del elemento.

II. ANTECEDENTES

II.1. Cultivo de tomate en México.

Las especies que se encuentran dentro de las hortalizas, son especies que poseen características destacables que los hacen muy importantes para el sector agrícola, económico y alimenticio, ya que tienen un alto valor nutricional, la demanda de hortalizas genera entrada de dinero y existen grandes superficies cultivadas, pero actualmente la mayoría de las hortalizas presentan bajos rendimientos, mayor susceptibilidad al ataque de plagas y enfermedades, así como, la influencia de las condiciones climáticas, por lo que, se avecina un problema en la producción de alimentos (Vallejo y Estrada, 2004). Dentro de la agricultura, la fertilización es uno de los aspectos más importante, puesto que es el factor que limita la producción agrícola. Debido a la importancia de la fertilización, se estima que el consumo de N-P-K durante los últimos 40 años ha incrementado de 5×10^4 toneladas a más de 5.5×10^6 toneladas (Peña-Cabriales *et al.*, 2001).

Dentro de las hortalizas, el tomate es el producto que ocupa el primer lugar de importancia (Ortiz, 2013), ya que, en Enero a Mayo del año 2016 alcanzaron mil 94 millones de dólares un incremento de 200 millones de dólares con un 22.7% más que el año 2015 y México se encuentra entre los principales países exportadores con una participación del 21 % a nivel mundial (SAGARPA, 2016).

II. 2. Producción agrícola en la actualidad.

Investigaciones realizadas han reportado que la producción agrícola ha cambiado a través del tiempo por una serie de factores que se ven involucrados en el crecimiento y desarrollo de las plantas, dichos factores que se contemplan es el cambio climático, que cambia las condiciones de temperatura y precipitación, por lo que, el reto a futuro es suministrar la cantidad necesaria de alimentos para todos los consumidores superando los factores limitantes, y optimizar el uso del agua, así como, la fertilización (SAGARPA y FAO, 2012). Para el año 2050 se estima que se alcanzará 9.6 mil millones de habitantes, por lo que se tendrá que

incrementar la producción en toneladas utilizando la misma cantidad de los recursos para la producción (ONU, 2013).

Por lo anterior, la creciente demanda de alimentos ha causado el deterioro de los suelos, puesto que, la agricultura es la actividad que mayor contribuye en este proceso, se han realizado investigaciones donde muestran que la pérdida de suelo va desde 3 a 40 ton/ha al año en las diferentes regiones, la pérdidas se da por diferentes factores, entre ellas, se encuentra la erosión y la salinidad de los suelos, lo que ocasiona la baja productividad que repercute en una baja rentabilidad para el productor ocasionando que el suelo sea abandonado (Samayoa y Flores, 1992). Para la producción de cultivos es necesario la fertilización, que consiste en suministrar los nutrientes esenciales para las plantas de manera sintética, ya que de esta actividad depende el crecimiento, desarrollo y rendimiento de los cultivos (FAO e IFA, 2002).

Dentro de los nutrientes esenciales para las plantas se consideran 16 elementos el carbono (C), hidrogeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), azufre (S), hierro (Fe), zinc (Zn), boro (B), manganeso (Mn), cobre (Cu), molibdeno (Mo) y cloro (Cl), (Raven *et al.*, 1992). Se les conoce como nutrientes esenciales, ya que, la ausencia de estos elementos impiden completar el ciclo de vida de las plantas o bien, aquellos que cumplen un papel importante en algún etapa fisiológica de la planta, por lo que, si no se encuentran en suficiente cantidad en el suelo es necesario la aplicación de fertilizantes para obtener los rendimiento proyectados (Raven *et al.*, 1992).

II.3. Problemas ambientales por el uso de fertilizantes.

El crecimiento poblacional se ha manifestado en las últimas décadas y con ello, la demanda de alimentos, con todo lo anterior se tuvo que extender áreas de superficie para seguir produciendo, así mismo, el uso de insumos para obtener los rendimientos esperados, fueron en incremento (de la Fuente y Suárez, 2008). Los insumos más ocupados en un sistema de producción agrícola son los agroquímicos (herbicidas, insecticidas, fungicidas, acaricidas, nematocidas, fertilizantes y fitohormonas). Dentro de los agroquímicos, los fertilizantes son los

más usados, ya que contiene los elementos minerales necesarios para el crecimiento de las plantas, pero también, son los que contribuyen a la contaminación ambiental.

Los principales problemas de contaminación causados por el nitrógeno son (Camargo y Alonso, 2007):

1. Acidificación de ríos y lagos.
2. Eutrofización de las aguas dulces y marinas.
3. Toxicidad directa de los microorganismos acuáticos.

Se ha demostrado que la acumulación del nitrógeno en aguas estancadas provoca el exceso crecimiento de algas, lo que trae como consecuencia el impedimento de la penetración de la radiación solar y la disminución del oxígeno, dichos elementos son esenciales para la vida acuática, por lo tanto, ante este problema, la vida acuática deja de existir.

El nitrógeno y el fósforo, así como, otros minerales son arrastrados o lixiviados por el agua, generando la acumulación de estas en aguas estancadas o bien en ríos. La presencia de estas tiene un efecto negativo en el medio ambiente (Campaña y Naranjo, 1988).

Con todas las problemáticas que hemos citado anteriormente, se han registrado estudios, donde se han hecho trabajos de restauración de suelos, conservación de suelos, incorporación de materia orgánica, uso de biofertilizantes, implementación de técnicas de cultivo semiforzados, instalaciones de sistema de riego por goteo, así como sustituir los fertilizantes, por otros que contaminen menos el suelo, etc. Dichos trabajos se enfocan en realizar un uso eficiente de los recursos naturales que están involucrados en el desarrollo y crecimiento de las plantas, con el objetivo de seguir generando la producción de alimentos sin afectar las futuras generaciones, este proceso de producción se le denomina agricultura sustentable, puesto que, es un sistema que engloba un conjunto de técnicas que se ve involucrado el sector económico, social y ecológico (Altieri y Nicholl, 2000).

Dentro de las técnicas modernas que se están considerando en la producción agrícola para obtener los rendimientos satisfactorios es la aplicación de la nanotecnología, sin embargo, el uso de la nanotecnología no es suficiente para solucionar la problemática de producción, por lo que, se puede combinar con la aplicación de biofertilizantes, que son un conjunto de microorganismos que se aplican al suelo, estos responden de acuerdo a las condiciones del suelo y a la especie vegetal, tienen la capacidad de colonizar las raíces generando una simbiosis entre planta y microorganismo, por lo que, se les conoce como microorganismos promotores de crecimiento (Acuña, 2003). Las PGPRs interactúan con la planta por mecanismos diferentes: a través de la producción de fitohormonas, fijación de N atmosférico, solubilización del P y a través de la liberación de sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, favoreciendo un mejor crecimiento de las plantas (Camelo *et al.*, 2011).

II. 4. La nanotecnología.

La Iniciativa Nacional de Nanotecnología (INN), define que la nanotecnología es la ciencia, la ingeniería y la tecnología realizada en nanoescala, que va de 1 a 100 nm, es el estudio y aplicación de las cosas extremadamente pequeñas, que está ayudando a mejorar e incluso a revolucionar muchos sectores en la industria y la tecnología: como tecnología de la información, seguridad nacional, medicina, transporte, energía, seguridad alimentaria, ciencias ambientales, entre otros.

La nanotecnología es una tecnología revolucionaria, ya que se desarrollan nuevos materiales o el descubrimiento de nuevas propiedades en materiales ya conocidos (Záyago-Lau y Foladori 2010). Los materiales en nanoescala presentan propiedades de resistencia, reactividad, conductibilidad, flexibilidad, durabilidad y toxicidad diferente a los mismos materiales en tamaño mayor. Por ser una tecnología revolucionaria permite trabajar con niveles atómicos, moleculares y macromoleculares para crear nuevas estructuras con nuevas propiedades funcionales (Bawa *et al.*, 2005).

II. 5. Ventajas del uso de la nanotecnología.

Si bien es cierto, la nanotecnología es una ciencia multidisciplinaria que involucra la física, la ciencia de los materiales, la química, la biología, la ingeniería biomédica, la ciencia de la superficie, la ingeniería eléctrica y la robótica (Subramani y Ahmed, 2018). Por lo que, dicha tecnología se ve involucrada en el desarrollo de los sectores industria, medicina y agrícola. Sin embargo, dentro de la literatura se registran ciertas ventajas y desventajas de la tecnología más novedosa del momento, por lo que, es necesario plasmarlas para comprender las ventajas y limitaciones de la nanotecnología y sus aplicaciones en una amplia gama de disciplinas.

El uso de la nanotecnología en la agricultura presenta los siguientes ventajas e interrogantes (Quispe Challco, 2010).

Ventajas

- Mejora la calidad de los productos consumidos.
- Mejora la capacidad de los cultivos en la absorción de los nutrientes.
- Resistencia al ataque de patógenos.

Interrogantes

- Los ecosistemas, son sistemas complejos al entendimiento humano y no se conocen las consecuencias que puedan tener al ser asimilados por otros organismos vivos.

II. 6. La nanotecnología en México.

Brasil ocupa el primer lugar con mayores iniciativas, proyectos académicos y de investigación en la nanotecnología seguido de México, que se encuentra en la segunda posición en el desarrollo de la nanotecnología en relación con otros países de Latinoamérica y cuenta con un gran número de instituciones que realizan investigación, así como, las publicaciones que se han realizado acerca de la nanotecnología (Foladori, 2006). México ha tenido un desarrollo lento en la

nanotecnología y nanociencia, sin embargo, se están realizando grandes esfuerzos para apoyar a las áreas de investigación enfocados en la nanotecnología (Juanico *et al.*, 2016). Se ha mencionado anteriormente que la nanotecnología está involucrada en muchos sectores y que promete ser una solución ante posibles problemas, ya que, se considera benéfica (Foladori y Invernizzi, 2005).

II. 7. Nanotecnología en el sector agrícola.

Dentro del sector que nos interesa estudiar para este trabajo de investigación es el agrícola, uno de los sectores más importantes para la producción de alimentos. En la agricultura, la nanotecnología es un nuevo reto para la investigación y desarrollo de tecnología a un nivel de nanoescala (Poddar *et al.*, 2018).

El uso de la nanotecnología en la agricultura puede aumentar la producción minimizando los costos, esto se debe a que las nanopartículas aumentan el contacto superficial en comparación con las partículas convencionales, por lo tanto, se puede reducir los requerimientos de fertilizantes, el uso de pesticidas, así como, optimizar el uso del agua reduciendo hasta un 30-50 % (Sahoo, 2014). Con los beneficios mencionados anteriormente desencadenan un sin fin de ventajas como: reducir la contaminación del suelo por salinidad, reducir la contaminación del agua por eutrofización, disminuir la pérdida de insectos benéficos, reducir el impacto sobre el medio ambiente y la salud humana (de Oliveira *et al.*, 2014).

Dentro de la agricultura, la aplicación de la nanotecnología es la fabricación de nanofertilizantes, pesticidas y herbicidas que ayudan a la producción sostenible (Duhan *et al.*, 2017). Los fertilizantes son los elementos minerales que necesitan las plantas para su crecimiento y desarrollo. Sin embargo, dichos elementos no son como las que se conocen o las que se usan normalmente en la nutrición vegetal. Los nanofertilizantes tienen la característica de poseer un tamaño muy pequeño que va a una escala de 1 a 100 nm, la aplicación de estos nanofertilizantes, logran reducir el uso de fertilizantes, minimizan los efectos negativos por una posible sobredosis, reduce la toxicidad del suelo y disminuye la

frecuencia de aplicación (Naderi y Danesh-Shahraki, 2013). Los nanofertilizantes son absorbidos por las plantas de una manera rápida y completa. Sin embargo, actualmente existe otra tendencia similar que también permite ahorrar el uso de fertilizantes y, para ello, se están generando fertilizantes encapsulados (Mousavi y Rezaei, 2011); la diferencia de los nanofertilizantes no encapsulados a un encapsulado, es que, el nanofertilizante encapsulado está protegido por una matriz polimérica evitando que, el elemento tenga un contacto directo con el medio ambiente e ingredientes activos (Kashyap *et al.*, 2015).

Las cualidades que se han mencionado al aplicar la nanotecnología en la agricultura, se permiten a hablar de una agricultura sustentable, ya que puede tener impacto beneficioso en varios desafíos agrícolas, forestales y ambientales en el manejo sostenible de los recursos (Lavicoli *et al.*, 2017). Datos científicos aseguran que el uso de esta tecnología puede minimizar los problemas de las prácticas agrícolas sobre el medio ambiente y la salud humana mejorando la seguridad alimentaria y la productividad (Fraceto *et al.*, 2016).

II. 8. Nanofertilizantes encapsulados.

Los nanofertilizantes encapsulados, tienen la capacidad de liberar el elemento de una manera lenta, registran mayor absorción por la planta, las pérdidas por lixiviación y volatilización son menores, por lo que, se aprovecha mejor el elemento (Kashyap *et al.*, 2015). La liberación es retardada por varios mecanismos: utilizan recubrimiento semipermeable, oclusión, polímeros insolubles en agua, entre otras (González, 2011). Se les conoce como fertilizantes de acción lenta o controlada por dos mecanismos característicos de estos materiales:

- 1.- Retardan la disponibilidad del nutriente para las plantas.
- 2.- y la otra es que, al tener una liberación lenta, el nutriente es capaz de permanecer por un periodo largo en el medio (Hurtado *et al.*, 2007).

Sin embargo, este puede estar expuesto a los cambios de pH, temperatura, humedad del suelo, conductividad eléctrica, así como, estar interactuando con los microorganismos del suelo, pero hasta el momento no se ha encontrado que estos

factores sean una limitante para la aplicación de nanofertilizantes encapsulados directamente en el suelo.

Un nanofertilizante encapsulado consiste en proteger el fertilizante convencional por recubrimiento o encapsulación haciéndolo pasar por un material soluble a insoluble, permeable o semipermeable, de esta manera se controla la entrada del agua al material encapsulado, por lo que, la liberación del nutriente es lenta, permitiendo que los nutrientes se absorban de acuerdo a las necesidades de la planta (González *et al.*, 2005). Los materiales que se utilizan para el encapsulamiento pueden ser gelatinas, grasas, aceites, goma arábica, alginato de calcio, ceras, nylon, almidón de trigo, maíz, arroz, papa, etc. (Huertas, 2010).

Al comparar un fertilizante químico con un nanofertilizante en cuanto a costos, resulta ser más barato la aplicación de los nanofertilizantes ya que se requiere en pequeñas cantidades, lo que generaría mayores ganancias para el productor (Rameshaiah y Jpallavi, 2015).

Actualmente, en la literatura podemos encontrar diferentes trabajos enfocados al uso de nanopartículas. Nakasato *et al.* (2017), mencionan que las nanopartículas en altas concentraciones puede ser tóxico, ya que, en el estudio no encontró germinación de maíz a dosis altas, por lo que, es necesario saber la dosis adecuada para cada cultivo. El uso de las nanopartículas en la agricultura ha demostrado ser benéfico, puesto que, tienen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas. Estudios realizados por Javed *et al.* (2017), reportan que al aplicar óxido de zinc a una concentración de 1 mg/L genera mayor porcentaje de formación de brotes en *Stevia rebaudiana* Bertoni. Otro estudio realizado en cultivo de algodón, encontraron que, la aplicación de nanopartículas de ZnO, promueve un incremento en el crecimiento y la biomasa total por 130.6% y 131%, superando el testigo, así como, el aumento en la clorofila, carotenoides y proteínas solubles (Venkatachalam *et al.*, 2017).

Hurtado *et al.* (2007), al realizar una microencapsulación del nitrógeno y evaluar la liberación de este elemento comparando con un fertilizante comercial encontraron que, el microencapsulado se mantiene por mayor tiempo en el medio, mientras

que, el convencional no, llegando a la conclusión que, el número de aplicaciones pueden disminuir sin afectar el desarrollo de las plantas. En un trabajo similar de encapsulación de NPK con polisulfona a diferentes porcentajes de porosidad, encontraron que, con 38.5% de porosidad después de 5 horas de prueba el amonio fue liberado al 100%, mientras que, a una porosidad del 11% con el mismo tiempo de prueba, solo libero el 19% logrando mayor eficiencia que en los fertilizantes NPK convencionales (Tomaszewska y Jarosiewicz, 2002). A Melaj y E Daraio (2012), al estudiar tres matrices poliméricas quitosano, xantano y la combinación de estas para la encapsulación del KNO_3 encontraron que el quitosano es el que libera en menor tiempo el fertilizante, mientras que el xantano y la combinación de estas matrices liberan en pequeñas cantidades por un mayor tiempo de disponibilidad. Al evaluar la encapsulación de la urea con doble recubrimiento a base de etilcelulosa y polímero superabsorbente basado en almidón se reportó que el nitrógeno encapsulado se liberaba de una manera más lenta en el suelo que las partículas de urea sin revestimiento (Qiao *et al.*, 2016).

Estudios recientes realizados por Chen *et al.* (2018), reportan que al realizar una mezcla de biochar de maíz, arroz y carbón vegetal más copolímero mejora las propiedades para ser utilizado como un revestimiento y encapsular el nitrógeno, puesto que, son más eficaces en la resistencia al agua, así como, una degradabilidad más rápida en el suelo. El copolímero de arroz con base de biochar recubriendo urea exhibió un excelente rendimiento de liberación lenta de 65.28% al final de la prueba de lixiviación. También se han probado materiales de óxido de grafeno como revestidos de KNO_3 y han encontrado ser prometedoras para el desarrollo de fertilizantes de liberación controlada ambientalmente benéficos (Zhang *et al.*, 2014).

Qiao *et al.* (2016), al determinar la liberación de la urea en el suelo reportan que, el fertilizante recubierto con etil celulosa (EC) más almidón de papa mostro tener excelente propiedad de liberación lenta, con una cantidad de liberación 40% a 24 horas y podría liberar constantemente el nutriente durante un periodo de aproximadamente 70% a las 96 h, mientras que el fertilizante encapsulado con

almidón de maíz y EC no tuvieron el mismo comportamiento. Sin embargo, tuvieron una liberación del 60%, este mismo autor menciona que la liberación de nutrientes experimenta tres etapas (Fig. 1):

1. El agua se embebió en el almidón penetrando la capa del EC.
2. El nutriente que se encuentra en el núcleo podría disolverse gradualmente por el agua.
3. El nutriente fue entregado en el suelo al penetrar a través de las capas de EC y el almidón.

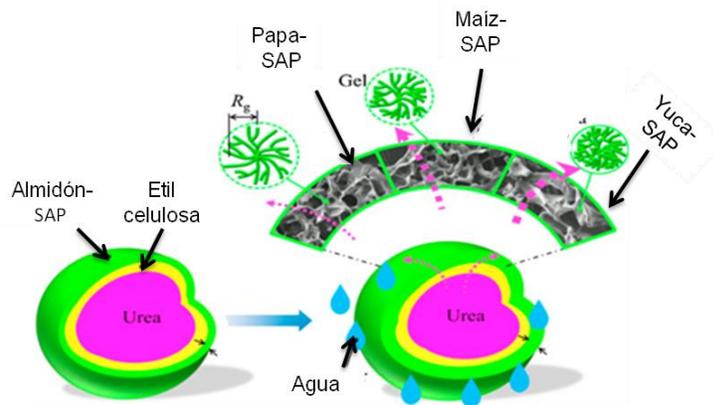


Figura 1. Ilustración de un fertilizante de urea encapsulado con diferentes matrices de polímeros y su forma de liberación de acuerdo al biopolímero. Imagen modificada de Qiao *et al.* (2016).

Estudios enfocados en la liberación del P encapsulado se ha encontrado lo siguiente:

Teixeria *et al.* (2016), al evaluar la eficiencia del MAP recubierto bajo diferentes ácidos orgánicos con diferentes dosis de P y un testigo absoluto en plantas de maíz bajo invernadero, reportan que, la eficiencia agronómica del P aplicada como fertilizantes de liberación lenta fue de 3 a 13 % mayor que el MAP sin recubrimiento. Por otro lado, mencionan que, el MAP convencional sin recubrimiento condujo a la menor disponibilidad del mineral en el suelo cuando se aplicaron niveles más altos de P, mientras que los fertilizantes recubiertos alcanzaron mayor disponibilidad en el suelo, por lo que concluyen de que, los fertilizantes recubiertos con ácidos orgánicos modifican el patrón de liberación de P, el movimiento del gránulo de fertilizante al suelo y la disponibilidad de P en las

plantas a lo largo del tiempo. Por otro lado, se ha determinado si diferentes cantidades y formas de fertilizante de P afectan la diversidad de hongos micorrizicos y la composición de la comunidad asociada con las raíces de las plantas de manzana, donde encontraron que, aquellas plantas tratadas con fertilizantes de liberación lenta, mostraron mayor riqueza de hongos micorrizicos que las tratadas con fertilizantes químicos, por lo que, concluyen que los fertilizantes de liberación lenta promueven la diversidad de los hongos mediante el control de los niveles de P disponible para las plantas y la concentración del P en el suelo es menor (Van Geel *et al.*, 2016). También se ha estado sintetizando materiales súper absorbentes biodegradables utilizando ácido acrílico reticulado y fósforo granular soluble en agua para un fertilizante de liberación lenta, muestran tener una capacidad de retención de agua y liberar lento el fertilizante, no son tóxicos, son amigables con el medio ambiente y suelo (Tyliszczak *et al.*, 2009).

II. 9. Matrices de encapsulamiento y su efecto en la liberación lenta.

Una matriz polimérica tiene propiedades físicas y estructurales adecuadas para funcionar como una envoltura, proteger un agente activo y con ello, obtener una liberación lenta (Nakamatsu, 2017). Los recubrimientos son matrices formuladas a base de lípidos, proteínas y carbohidratos o bien una mezcla de estos componentes que registran diferentes propiedades fisicoquímicas (Ramos-García *et al.*, 2010). El almidón es un polisacárido que se encuentra de manera natural en muchos productos agrícolas (Flores-Gorosquera *et al.*, 2004) y acorde a sus propiedades resulta buen candidato para el encapsulamiento de fertilizantes. Los polisacáridos para recubrimiento son los más usados debido a sus propiedades mecánicas de adherencia y flexibilidad (Meza, 2006).

II. 10. Situación actual del fósforo y su importancia en la agricultura.

El fósforo (P), es uno de los elementos más importantes en las plantas que no puede ser sustituida por otro elemento, además, es un elemento no renovable, por lo que, corre el riesgo de una escases en la oferta, desencadenando un sin fin de problemas dentro del área agrícola, económica y social (Smol *et al.*, 2016). La importancia del P consiste en la conformación de las moléculas de los ácidos

nucleicos y está presente en los procesos energéticos de las plantas en forma de ATP (Theodorou y plaxton, 1993). El P, es considerado inmóvil en el suelo, sin embargo, se registran pérdidas por escurrimiento, erosión o lavado (Pose *et al.*, 2012). Se estima, que las reservas globales del P se acabarán en aproximadamente 100 años, ya que, actualmente las pérdidas del P por erosión y precipitación son de 11.4 millones de toneladas al año, por lo que, se avecina un problema mundial en la producción de alimentos, generando un caos alimenticio (Cofie *et al.*, 2010).

Por otro lado, el crecimiento de la población mundial ha impulsado el aumento del uso del P como fertilizante en las actividades agrícolas y ha surgido una cierta preocupación por el rápido agotamiento del recurso (Cereza, 2017). La fuente principal del P es fosfato de roca, pero su extracción ha ido creciendo (Liu *et al.*, 2008), alcanzando la demanda del P en el 2016 con 194 millones de toneladas y se prevé que seguirá aumentando. La preocupación del agotamiento mineral ha generado la búsqueda de nuevas técnicas que mejoren el uso eficiente del mineral, dentro de las investigaciones se han encontrado bacterias que tienen la capacidad de liberar ácidos para solubilizar el P (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010). Sin embargo, se ha empleado el uso de la nanotecnología para fabricar nanofertilizantes encapsulados para su liberación lenta. Conjuntando estas dos alternativas, se cree que se puede tener un mejor aprovechamiento del elemento.

II. 11. Fósforo en el suelo.

La concentración del P en un suelo se encuentra alrededor de 0.05% y solo el 0.01 % es disponible para las plantas (Tilak *et al.*, 2005). El P proviene de las apatitas y depósitos de fosfato natural donde es liberado a través de la meteorización por la acción de factores bióticos y abióticos, el fósforo inorgánico (Pi), se encuentra en el suelo como fosfatos de Ca, Fe, Mg y Al en las arcillas del grupo caolinitas, por lo que, al ser precipitadas o fijadas la planta no puede beneficiarse del elemento (Rincón y Gutiérrez, 2012).

El P se puede encontrar de dos formas en el suelo orgánico e inorgánico y su disponibilidad para las plantas depende de las reacciones fisicoquímicas y biológicas en el suelo (Boschetti *et al.*, 2003). El P disponible para las plantas es aquella que se encuentra en la solución del suelo como iones fosfato diácido y monoácido (Silva Rossi *et al.*, 2006).

La diversidad de los suelos influye directamente en la disponibilidad del P, puesto que, en suelos alcalinos con una presencia elevada de calcio se forma fosfatos de calcio mientras que en suelos ácidos forman precipitados de fosfatos de aluminio y de hierro (Fernández, 2007).

II.12. Movilidad del fósforo.

El elemento P por ser el menos móvil en el suelo, es el principal elemento que limita la producción si no se suministra de manera inmediata (Devau *et al.*, 2009). De manera natural, el P al ser un nutriente limitante, afecta el rendimiento de los cultivos, en especial en suelos ácidos o alcalinos (Daroub *et al.*, 2003).

La aplicación del P en los suelos es muy especial, ya que, es un elemento de baja movilidad, estudios realizados por (Aguilar-Acuña *et al.*, 2006) encontraron que al aplicar el elemento en un sistema de riego por goteo superficial así como, sub-superficial el movimiento del P es un patrón esférico y hemisférico para el riego superficial, las mayores concentraciones de P se ubicaron cerca del emisor (10 cm), con lo anterior, se muestra que el elemento tiene una movilidad muy baja y por lo tanto se ve afectada la eficiencia del mismo.

La disponibilidad del P está fuertemente relacionada con las condiciones del suelo. El pH es uno de los parámetros que se mide en el suelo ya que de ello depende la disponibilidad de los minerales, (Lara *et al.*, 2011) reportan que a un pH entre 6.6-7.4 se da la mayor solubilidad del P, mientras que a un pH alcalino la solubilidad es limitada, ya que se forman fosfatos de calcio insolubles y en suelo muy ácidos interacciona con el hierro y aluminio por lo que no es aprovechable para las plantas.

II.13. Influencia de las bacterias en la disponibilidad de nutrientes.

La microbiota asociada a las raíces de las plantas, es el componente más importante del suelo, ya que la interacción entre ambos define la fertilidad, puesto que, están involucrados en las actividades biogeoquímicas, permitiendo la disponibilidad de los nutrientes para las plantas (Sivila de Cary y Angulo, 2006). La liberación de nutrientes y fitohormonas intervienen en la promoción del crecimiento vegetal mediante la interacción entre la planta y el microorganismo (Berg, 2009). Las PGPRs también tienen la capacidad de inducir el crecimiento de la planta a través de la producción de compuestos volátiles y favoreciendo la respuesta de defensa de la planta (Cappellari *et al.*, 2017).

Previos estudios han mostrado el papel que juegan las rizobacterias en la promoción del crecimiento de las plantas. Trabajo realizado por Reyes *et al.* (2008), al incorporar rizobacterias en las plantas de tomate y maíz, encontraron que estas promueven el porcentaje de germinación, así como, incrementan el porcentaje de N y P en el tejido de la planta. Otro estudio similar realizado por Sánchez-López *et al.* (2012) mencionan que al inocular rizobacterias en plantas de tomate lograron registrar mayor biomasa, desarrollo de la planta y rendimiento, esto lo asocian en que las bacterias presentan actividad fosfatasa, favoreciendo la liberación del P.

Dentro de las rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPRs) se encuentran las del género *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Erwinia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter* *Flavobacterium*. Actualmente en el mercado se puede encontrar el género *Bacillus* es utilizado en la formulación de pesticidas microbianos, fungicidas y biofertilizantes (Pérez-García *et al.*, 2011).

Estudios realizados por Terry *et al.* (2005) encontraron que, en el tomate se registra la colonización de los géneros de *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Streptomyces* interactuando con las plantas. Algunas cepas del género *Bacillus* producen ácido indolacético (AIA) de 0.9 a 2.3 mg/L, solubilizan fosfato tricálcico 18.5 a 34.7 mg/L y son capaces de fijar el nitrógeno,

por lo que, tienen la potencia de ser usados como biofertilizantes en la agricultura (Luna *et al.*, 2013).

Las bacterias del género *Bacillus* tienen la capacidad de ser resistentes debido a que son capaces de formar esporas, por lo que, se pueden encontrar en cualquier ambiente como suelo y agua. Estas bacterias tienen el potencial de producir antibióticos, enzimas, solubilizar fosfatos y fijar nitrógeno; este género cuenta con muchas especies que se encuentran asociadas a las plantas, permitiendo la promoción del crecimiento vegetal y el control de patógenos por medio del control biológico, las especies más estudiadas son el *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. circulans* y *B. cereus* (Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

Bacillus subtilis tiene la capacidad de solubilizar el P mediante tres mecanismos (Restrepo-Franco *et al.*, 2015):

- La liberación de ácidos orgánicos.
- La quelación de los elementos responsables de la insolubilización de fosfatos.
- La asimilación directa de fosfatos que son incorporados en la célula y que posteriormente son liberados en el suelo.

II.14. Biomasa microbiana.

El ciclo del P en el suelo es muy complejo y dinámico, al grado de que la acumulación del elemento mineral se ve involucrado en la biomasa microbiana, materia orgánica y formas inorgánicas (Picone y Zamuner, 2002).

La biomasa microbiana está estrechamente relacionada con la conservación del suelo, entre más biomasa microbiana significa mayor fertilidad del suelo, puesto que, los microorganismos participan en la fijación y solubilización de algunos elementos minerales necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Cadena *et al.*, 1998). En la biomasa microbiana se encuentra almacenado el P de manera inmovilizado que potencialmente puede ser utilizado para el desarrollo de las plantas (Richardson, 2001)

Ciertos factores abióticos intervienen en la biomasa microbiana del suelo como el cambio climático, condiciones geográficas, actividades antropogénicas, profundidad, propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, por lo tanto, la cantidad de elementos minerales disponibles tienden a bajar o aumentar (Rincón y Gutiérrez, 2012). Con esto se entiende que la cantidad del P disponible para las plantas está influenciada por la biomasa microbiana, así como, los factores abióticos, ya que, la actividad metabólica y colonización de los microorganismos responden a la temperatura del suelo, humedad y disponibilidad del carbono (Richardson y Simpson, 2011).

Las cepas que han demostrado ser más potentes para la disolución de fosfatos son los del género *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* (Rodríguez y Fraga, 1999). Las cepas de *Bacillus subtilis* son bacterias promotoras del crecimiento de muchos cultivos y actualmente estos microorganismos son comerciables (Posada *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que los microorganismos que se encuentran en el suelo están interactuando con las raíces de las plantas, dicha interacción ocurre en un espacio conocido como rizósfera, en el cual puede generarse un efecto positivo o negativo, de acuerdo a sus funciones se agrupan de la siguiente manera (Pedraza *et al.*, 2010):

- Degradadores de residuos orgánicos.
- Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.
- Bacterias y hongos antagonistas de patógenos de raíces.

El suelo es uno de los recursos más importantes para la agricultura orgánica y la calidad de esta no solo depende de la composición química, sino también la parte biológica cuantitativa y cualitativa que habitan en él (Giri *et al.*, 2005). La importancia de la actividad microbiana es esencial para la agricultura (Pedraza *et al.*, 2010).

El P que se encuentra en el suelo está presente de una manera móvil e inmóvil. Sin embargo, las plantas y los microorganismos han desarrollado mecanismos

para movilizar el P, de esta manera, ser incorporado al sistema vivo. La competencia entre plantas y microorganismos por adquirir el P es complejo, sin embargo, los microorganismos son los ganadores, ya que, tienen la capacidad de absorber los nutrientes e inmovilizar los nutrientes en la biomasa antes de que alcancen la superficie de la raíz, este P en algún momento es aprovechado por las plantas (Marschner *et al.*, 2011).

La colonización de las bacterias u hongos en la raíz son seleccionados por la planta a través de la secreción de exudados radiculares usados para el crecimiento del microorganismo, es por ello que, el uso de biofertilizantes está influenciado por la especie vegetal, tipo de suelo y condiciones ambientales (Tilak *et al.*, 2005).

Los hongos y bacterias influyen en la liberación del P, los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* son microorganismos que se les considera más eficientes para solubilizar fosfato (Tilak *et al.*, 2005). Otra de las características que se les atribuye a los microorganismos es que pueden aumentar el área de superficie de las raíces, favoreciendo la toma del P disponible y agua del suelo (Richardson, 2001). Las micorrizas arbusculares son microorganismos que se encuentran de manera natural que intervienen en la nutrición de las plantas de manera positiva (Peña-Venegas *et al.*, 2007).

La aplicación de PGPR en el suelo es un paso para el desarrollo de la agricultura sustentable, ya que de esta manera el uso de fertilizantes sintéticos se verá reducido y por lo tanto se estaría contribuyendo a mejorar la calidad ambiental, así como, la del suelo (Pedraza *et al.*, 2010).

Los microorganismos solubilizadores del P tienen la característica de liberar ácidos orgánicos como: oxálico, cítrico, butírico, malónico, láctico, succínico, málico, glucónico, acético, glicónico, fumárico, adípico e indolacético, estos ácidos forman complejos estables del Al y Fe, disminuyen el pH de la rizosfera permitiendo la disponibilidad del P, Fe, Zn y Mn (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010).

El uso de los microorganismos conocidos como biofertilizantes proporcionan una alternativa en el sector agrícola, permitiendo minimizar el uso de fertilizantes químicos y con ello disminuir la contaminación ambiental (Fernández y Rodríguez, 2005). Las PGPR han demostrado que además de promover el crecimiento de las plantas también tienen funciones más amplias, ya que, las plantas inoculadas pueden tolerar factores bióticos y abióticos (López *et al.*, 2007).

II.15. Liberación de moléculas de las bacterias en el suelo.

El suelo es uno de los sistemas más dinámicos, dentro de dicho sistema se manifiesta la presencia de microorganismos mediante la bio-mineralización y la sinergia de co-evolución con las plantas (Gouda *et al.*, 2018). El suelo es un sistema vivo que, por muchos años, existe una lucha a nivel microscópica para la sobrevivencia de microorganismos, la interacción con las plantas para generar un beneficio, la productividad de los ecosistemas está fuertemente influenciada por la presencia de estos microorganismos.

Durante muchos años, a través de estudios, experimentos y revisiones bibliográficas se ha tratado de describir, los mecanismos que utilizan los microorganismos del suelo para mantener un ecosistema con vida, dentro de los resultados se destaca la participación de efectos directo o bien indirectos, estas células sobrevivientes del suelo son capaces de liberar moléculas que promueven el crecimiento vegetal.

II.16. Generalidades de *Bacillus subtilis*.

Son bacterias que se pueden encontrar en cualquier ambiente, ya que, tienen la capacidad de formar esporas que les permite subsistir por mucho tiempo y colonizar la rizósfera cuando encuentran las condiciones adecuadas, estas bacterias pueden desplazar la colonización de otras bacterias, puesto que, liberan sustancias que inhiben el crecimiento y desarrollo normal del microorganismo, por lo que, pueden ser utilizados como organismos biocontrol (Layton, 2011).

La rizobacteria *Bacillus* ha demostrado tener la capacidad de colonizar las plantas de tomate y la eficiencia de colonizar en las puntas de las raíces (Gao *et al.*,

2016). Son bacterias en forma bacilos aerobios y anaerobios facultativos, Gram positivos, las esporas son de forma ovalada o cilíndrica, la colonización abunda cuando se encuentran en pH de 5.5 a 8.5 con humedad abundante (Layton, 2011). *B. subtilis* ataca principalmente a los hongos patógenos de vegetales. La actividad antifúngica se da gracias a la liberación de polipéptidos como la iturina, subtilina, bacitracina, micobacilina, micosubtilina, fengimincina, surfactina y bacilomicina que controlan *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Phytophthora* y *Gaeumannomyces* (Ramos Hernández *et al.*, 2011).

II.17. Colonias típicas de *Bacillus subtilis*.

Las colonias de *B. subtilis* en placas de agar dan un aspecto blanquecino, de forma circular e isotrópica, con bordes irregulares, con ramas casi rectas y de la misma longitud, tiene un crecimiento radical denso tal y como puede observarse en la Figura 2 (Fujikawa y Matsushita, 1989).

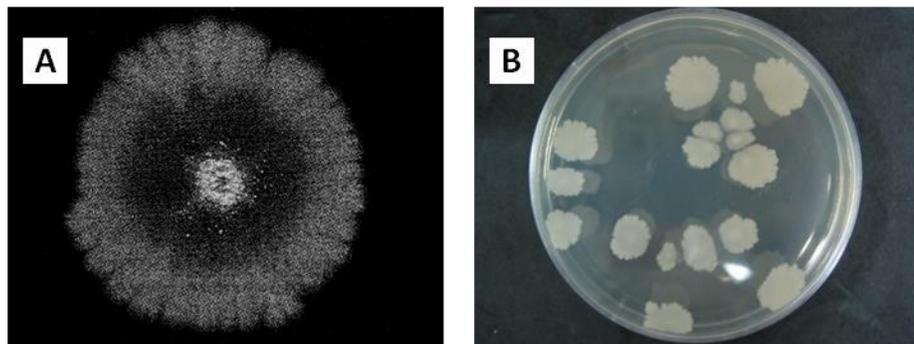


Figura 2. Características morfológicas de las colonias de la bacteria *Bacillus subtilis*: A) Diseño fractal de las colonias *B. subtilis*, B) Colonias de la bacteria *B. subtilis* en placas con agar. Imagen tomada de Fujikawa y Matsushita. (1989).

Para identificar bacterias se han desarrollado técnicas sencillas y rápidas, una de ellas es la tinción Gram, dicha tinción es una técnica que se ha empleado de manera rutinaria en laboratorios de microbiología, definida como una tinción diferencial, ya que, utiliza dos colorantes y clasifica a las bacterias en Gram

positivas y Gram negativas (López-Jácome *et al.*, 2014). Las bacterias *Bacillus subtilis* son consideradas como Gram positivas y en forma de bacilo. La morfología de colonias de esta bacteria es con borde aserrado, centro elevado, en forma de anillo con consistencia cremosa y pegajosa (Astorga-Quirós *et al.*, 2014).

II.18. *Bacillus subtilis* cepa LPM1.

Bacillus subtilis LPM1 es una bacteria aislada del cultivo de manzano y presenta varios efectos benéficos como (Chávez *et al.*, 2006):

- Promoción del crecimiento vegetal.
- Producción y liberación de sideróforos.
- Son bacterias antagónicas y/o actúan como agentes de control biológico contra hongos fitopatógenos como del género *Fusarium sp.*
- Son bacterias que producen antibióticos y enzimas líticas.
- Sintetizan amilasas y proteasas.
- Es capaz de biosintetizar la enzima ACC desaminasa empleando el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) como sustrato.

III. HIPÓTESIS

La aplicación del nanofertilizante de fósforo encapsulado con almidón tendrá un efecto positivo en el crecimiento de las plantas de tomate colonizadas por la rizobacteria promotora del crecimiento vegetal *Bacillus subtilis*.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la aplicación del nanofertilizante de fósforo encapsulado con almidón sobre el crecimiento de plantas de tomate co-inoculadas con la cepa promotora de crecimiento vegetal *Bacillus subtilis* LPM1.

IV. 1. Objetivos específicos

- Evaluar la promoción del crecimiento en plantas de tomate colonizadas por *Bacillus subtilis* LPM1 y tratadas con el nanofertilizante de fósforo encapsulado con almidón.
- Evaluar el establecimiento de *B. subtilis* LPM1 en raíces de tomate previamente tratadas con el nanofertilizante de fósforo a 3 intervalos de tiempo.
- Cuantificar el contenido total de fósforo en tejido foliar y radicular de plantas de tomate por las diferentes combinaciones entre tratamientos con *B. subtilis* LPM1 y nanofertilizante de fósforo encapsulado.

V. MATERIALES Y METODOS

V. 1. Localización del sitio experimental.

El presente trabajo de investigación se realizó en Saltillo, Coahuila, México, específicamente en las instalaciones del Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), en un invernadero de baja tecnología, cuyas coordenadas son $25^{\circ} 27' 37''$ N y $100^{\circ} 58' 08''$ O, y una altura de 1503 msnm. El experimento se realizó en el año 2017 y posteriormente se repitió en el año 2018 bajo las mismas condiciones de aplicación de tratamientos.



Figura 3. Localización del sitio experimental (fuente Google Earth). A) Vista general del CIQA. B) Área de invernaderos. C) Área de trabajo principal en el invernadero mediana tecnología.

V. 2. Nanofertilizante de fósforo encapsulado con almidón.

El nanomaterial de fertilizante fosfórico encapsulado fue proporcionado por el Dr. Carlos Espinoza González del Departamento de Materiales Avanzados del CIQA. Dichos materiales fueron generados utilizando como matriz al polisacárido almidón de maíz, formadas mediante un proceso de secado por aspersion de una solución acuosa previamente formulada con almidón y una sal fertilizante fosfatada que fue fosfato monopotásico (MKP), esto en función de la compatibilidad entre las fases. El nanofertilizante encapsulado con almidón fue caracterizado previamente, considerando propiedades físicas como el tamaño,

químicas como la composición por almidón y contenido de fósforo, todo el trabajo mencionado anteriormente se realizó por la estudiante Carolina Martínez Lara (tesis de Maestría en Polímeros en Proceso) del Departamento de Materiales Avanzados, quedando el fertilizante con una proporción de 70 % almidón y 30 % fertilizante. En la Figura 4 se muestra una micrografía en la cual se puede observar el fertilizante de fósforo encapsulado.

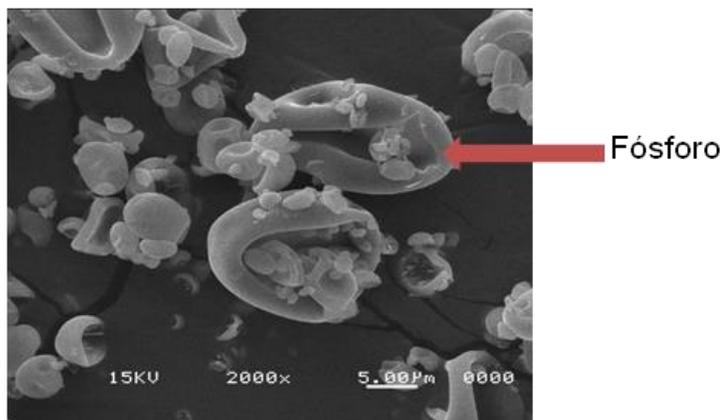


Figura 4. Morfología del nanofertilizante de fósforo encapsulado con almidón de maíz, la flecha indica el P encapsulado. Imagen obtenida mediante Microscopio electrónico de barrido modelo SM-510, marca TOPCON.

V. 3. Condiciones de crecimiento para la cepa promotora de crecimiento *Bacillus subtilis* LPM1.

La rizobacteria promotora del crecimiento que se utilizó en este trabajo corresponde a *Bacillus subtilis* LPM1 aislada previamente por Chávez *et al.* (2006) y fue proporcionada por el Dr. Alberto Flores Olivas del Departamento de Parasitología de la UAAAN. La cepa se creció en medio de cultivo LB a 30°C por 48 h y en todos los bioensayos en plántulas de tomate, se utilizó para la inoculación una población bacteriana de 1×10^8 UFC/mL, dato estandarizado por el Dr. Alberto Flores Olivas.

V. 4. Preparación del sustrato para la siembra de las plantas de tomate.

El sustrato que se utilizó para este experimento fue la mezcla de peatmoss y perlita a una relación de 70:30 v/v. La mezcla se realizó de una manera

homogénea humedeciendo el sustrato, posteriormente a la mezcla, el sustrato se colocó en bolsas con una capacidad de 2 kg, esto con la finalidad de esterilizar el sustrato en la autoclave digital (semiautomática EVAL) por una hora, posteriormente este sustrato fue utilizado para llenar macetas de 1.3 L.

Las semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* variedad Floradade), se germinaron en charolas de 200 cavidades que fueron desinfectadas previamente en cloro. Cinco días después de la emergencia, las plantas fueron regadas con agua. Una vez que las plántulas presentaron hojas verdaderas se fertilizaron con un fertilizante con nombre comercial peters 20-10-20. A los 28 días de la emergencia se realizó la primera inoculación de plantas directamente a la charola con la bacteria *Bacillus subtilis*. La cepa LPM1 que ya se tenía aislada fue resembrada en 10 mL de medio Luria Bertani (LB) líquido a una temperatura de 30 °C por 48 horas y a una agitación de 200 rpm. Una vez que ya se tenía crecimiento celular, los 10 mL de medio de cultivo LB fue aforada a 1 L con agua estéril, de esta solución se le agregó 10 mL/plántula directamente a la charola tal y como se muestra en la Figura 5 a una población de 1×10^8 UFC/mL. La población de bacterias que se aplicó, fue estandarizada por el Dr. Alberto Flores Olivas, donde a través de estudios realizados por él mismo y alumnos, determinaron que a una temperatura de 30 °C por 48 horas el crecimiento de las bacterias es de 1×10^8 UFC/mL.



Figura 5. Aplicación de la bacteria *Bacillus subtilis* a una población de 1×10^8 UFC/mL sobre planta directamente en la charola.

A los 5 días después de la inoculación se realizó el trasplante en macetas de 1.3 L utilizando el sustrato peat moss más perlita previamente esterilizado. 8 días después del trasplante (DDT) se realizó una segunda inoculación. Los riegos fueron suministrados mediante un sistema de riego localizado, distribuido en 5 riegos para suministrar 1 litro de agua/planta. Para cumplir con el requerimiento hídrico, se realizó lo siguiente: en tres emisores se colectó la cantidad de agua que drenaba por minuto, se obtuvo el promedio y en base a eso, se distribuyeron los riegos. 15 días después del trasplante, las plantas de tomate fueron en tutoradas con rafia color blanco.

La solución nutritiva para todas las plantas fue la de Steiner, eliminando el P de la solución nutritiva, ya que, este mineral se suministró directamente en la maceta. El pH de la solución nutritiva fue de 6.5 y la conductividad eléctrica de 2.5. Para nutrir a las plantas se consideró el análisis de agua y en base a ello se incorporaron los nutrientes para cumplir con la solución Steiner. En la tabla 1, podemos ver los fertilizantes que se utilizaron y la dosis.

Tabla 1. Nutrientes incorporados en la solución nutritiva Steiner.

FERTILIZANTES	DOSIS
Nitrato de calcio	0.417 g/L
Nitrato de potasio	0.695 g/L
Sulfato de amonio	0.108 g/L
Micronutrientes	0.067 g/L
ACIDOS	DOSIS
Acido sulfúrico	0.108 ml/L

V. 5. Aplicación de tratamientos y diseño experimental

La aplicación de tratamientos se realizó cada 10 días, es decir, del total del fósforo encapsulado y fósforo libre, se distribuyó en 3 aplicaciones por los 30 días

del primer bioensayo. Mientras que, para el segundo bioensayo, se realizaron 5 aplicaciones por los 45 días que permaneció el experimento.

Los tratamientos de este trabajo de investigación fueron los siguientes:

1.- Plantas control sin fósforo.	4.- Plantas tratadas con nanofertilizante encapsulado más <i>Bacillus subtilis</i> .
2.- Plantas tratadas con MKP libre más <i>Bacillus subtilis</i> .	5.- Plantas tratadas con nanofertilizante encapsulado.
3.- Plantas tratadas con MKP libre.	6.- Plantas tratadas con almidón sin procesar.

Para determinar la cantidad de fósforo/planta a aplicar, se realizó lo siguiente: en la etapa vegetativa las plantas de tomate demandan 33 Kg/ha de fósforo y para la etapa reproductiva demandan 34 Kg/ha. Se estima que en una hectárea la densidad de plantas es de 33 mil. En base a estos datos, se calculó la cantidad de fósforo a aplicar sobre planta, considerando inicialmente que, para el fertilizante encapsulado el 60% es almidón y 40% corresponde al fertilizante MKP. Sin embargo, por cuestiones ajenas a nosotros, nos notificaron que la proporción real es 70% almidón y 30% fertilizante.

Para determinar la cantidad de fósforo a aplicar se realizó lo siguiente:

1.- En la etapa vegetativa, las plantas demandan 33 Kg/ha de fósforo para 33 mil plantas.

Entonces: $33000 \text{ plantas} / 33\,000 \text{ g de fósforo} = 1 \text{ g de fósforo/planta}$

La composición del fosfato monopotásico MKP es de: N 0%- P 52%- K 34%, para cumplir con 1 g de fósforo/planta, se realizó una regla de tres: Sí en 100 g de MKP el 52 g corresponde al fósforo. Entonces, cuanto debo aplicar de MKP para cumplir con la dosis de 1 g de fósforo/planta?

Sí en 100 g de MKP ——— 52 g P_2O_2

1.923 g/planta de MKP ——— 1 g de fósforo

Con los cálculos realizados, se determinó aplicar 1.923 g de MKP libre/planta para la etapa vegetativa dividido en tres aplicaciones y 1.98 g de MKP libre para la etapa de floración una sola aplicación.

2.- Cálculos del encapsulado, considerando inicialmente que el 60% es almidón y 40 % es el fertilizante. Si en 100 g de encapsulado el 40% corresponde al fertilizante, entonces se necesita 4.8 g de encapsulado para la etapa vegetativa dividido en tres aplicaciones y 4.92 para la etapa de floración una sola aplicación.

Sí en 100 g de encapsulado — 40 % corresponde el fertilizante
4.8 g de encapsulado/ planta — 1. 923 g de fósforo

Sin embargo, cabe mencionar que, la relación del fertilizante cambió a 70 % almidón y 30 % fertilizante, por lo que, con esta modificación, las plantas tratadas con el MKP libre recibieron más P que las plantas tratadas con el encapsulado.

Los tratamientos antes mencionados se aplicaron un día después del trasplante donde: se aplicó 1.6 g/planta del nanofertilizante encapsulado para los tratamientos 4 y 5, 0.64 g/planta del fertilizante comercial libre (MKP) para los tratamientos 2 y 3, y 0.96 g/planta de la matriz sola para el tratamiento 6. Posteriormente a los treinta días, la dosis cambió a 1.64 g del nanofertilizante, 0.66 g de MKP libre y 0.984 de la matriz sola, esto debido a que, las plantas cambiaron de etapa vegetativa a floración. La proporción final del encapsulado fue de 70:30 % de almidón: fertilizante. En total, las plantas con encapsulado recibieron 1.932 g de P y 2.58 g de P en plantas con MKP libre (Fig. 6).



Figura 6. Aplicación del encapsulado en la base del tallo de las plantas de tomate.

El diseño experimental fue en bloques completamente al azar con 6 tratamientos y 24 plantas por tratamiento con 4 repeticiones, el análisis de varianza se realizó en software Infostat 2015 con una $p \leq 0.05$. Cabe mencionar que, para este trabajo se realizaron ensayos preliminares en el año 2017 bajo las mismas condiciones con 5 tratamientos excepto el tratamiento 6 y con 12 plantas por tratamiento con 3 repeticiones. Para el análisis nutricional de las plantas NPK en el bioensayo 2017 se realizó un análisis compuesto por falta de material (tejido vegetal).

V. 6. Colonización del microorganismo a 3 intervalos de tiempo.

Para evaluar los patrones de colonización en raíces de las plantas de tomate tratadas con el nanofertilizante encapsulado con almidón, se realizó la técnica de diluciones seriadas, para ello se realizó lo siguiente: tres análisis destructivos cada 15 días, en cada análisis destructivo se colectaron tres raíces de diferentes plantas del mismo tratamiento, dichas raíces fueron lavadas con agua de llave de manera cuidadosa para evitar el desprendimiento y pérdida de la biopelícula que se forma en la raíz, de estas se ocupó un gramo macerando en 100 mL de agua estéril todo bajo condiciones de esterilización y campana laminar. De la maceración se obtuvo un extracto, de este extracto se pasaron 100 μL en un tubo con 900 μL de agua estéril para tener una dilución de 1×10^{-1} , posteriormente de la primera dilución se tomó 100 μL y se agregó en otro tubo con 900 μL de agua estéril para tener una dilución de 1×10^{-2} , así sucesivamente hasta llegar 1×10^{-6} . Una vez que se tenían las diluciones, se pasaron 10 μL en cada caja Petri de cada dilución que contenía medio LB sólido (Fig. 7), para posteriormente incubar las placas de 24 a 48 horas a una temperatura de 30 °C.

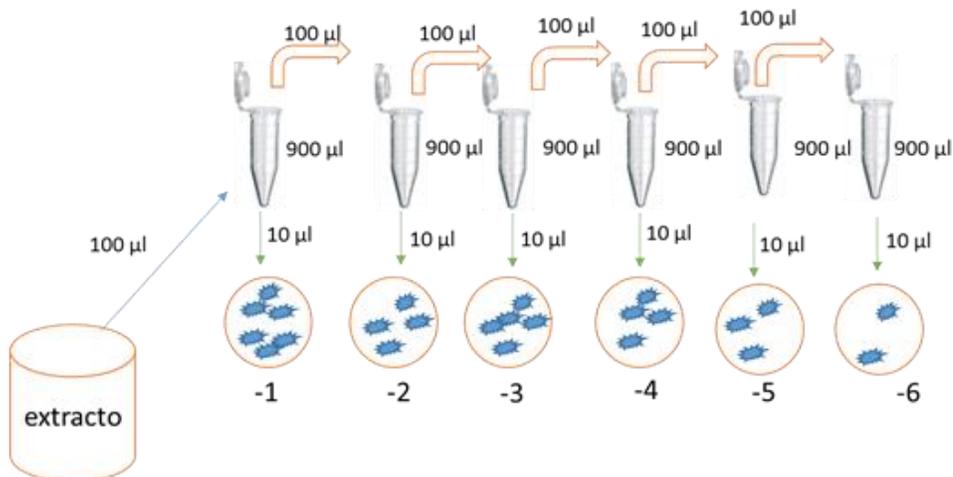


Figura 7. Diluciones seriadas y siembra de bacterias en placas con medio LB.

Todo lo anterior se realizó con la finalidad de detectar la presencia de la bacteria *B. subtilis* y realizar el conteo de colonias de todas las bacterias que se presentaron en las raíces, una vez que se detectó el crecimiento de las bacterias, se obtuvieron colonias puras y, a estas se le realizó la técnica de tinción Gram, para ver la bacteria en microscopio, ya que, es una bacteria Gram positiva y en forma de bacilos (Fig. 8).



Figura 8. Detección de bacteria *Bacillus subtilis*: A) Crecimiento de bacterias obtenidas de la raíz. B) Obtención de colonias puras. C) Tinción Gram de las colonias puras.

V. 7. Cuantificación del contenido total de fósforo en tejido foliar y radicular.

Para evaluar diferencias en la cantidad de fósforo presentes en las plantas de cada tratamiento, las plantas secas de cada colecta se molieron de manera separada la parte aérea y radicular, estas fueron etiquetadas y se mandaron a analizar a Laboratorio del INIFAP CENID RASPA, Gómez Palacio, Durango.

V. 8. Promoción del crecimiento vegetal.

Para determinar la promoción del crecimiento vegetal, se realizó el conteo de hojas, la medición del diámetro del tallo tomando el criterio de medir antes de los cotiledones con la ayuda de un vernier digital, la altura de las plantas fue desde la base del tallo hasta la presencia de las últimas hojas, la determinación del área foliar fue con el medidor del área foliar (LI-COR 3100), también se determinó peso fresco y seco de la hoja, tallo y raíz. El peso seco de las plantas se obtuvo metiendo las plantas en una estufa de secado de muestras a una temperatura de 75 °C por 4 días. También se realizó la medición de parámetros como fotosíntesis, transpiración y conductancia estomática con el IRGA (LI-6400XT Inc. USA).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se mencionó en el apartado de la metodología, este trabajo de investigación se repitió dos veces bajo las mismas condiciones de la aplicación de tratamientos y evaluación de parámetros, en la primera parte corresponden los resultados del año 2017.

VI. 1. Bioensayo realizado en otoño del 2017.

Los resultados obtenidos que corresponden a la promoción del crecimiento vegetal se representan en la Tabla 2, donde podemos observar las medias obtenidas de cada tratamiento con sus respectivas variables evaluadas, apreciamos que para las variables de crecimiento vegetal que corresponden a: número de hojas (NH), altura de la planta (AP), diámetro del tallo (DT), longitud de la raíz (LR) y área foliar (AF), se encontraron diferencias estadísticamente significativas, con la excepción de la variable NH; sin embargo, se observan diferencias significativas en la altura de la planta (AP), donde podemos observar que las plantas tratadas con MKP + *B. subtilis* (2) y nanofertilizante + *B. subtilis* (4), son las que presentaron mayor crecimiento en comparación al resto de los tratamientos: plantas sin P (1), así como, las plantas tratadas con el nanofertilizante (5) y MKP libre (3). Por otro lado, esta tendencia no se repite en la variable DT, puesto que, todos los tratamientos superaron a las plantas sin P, mientras que, en el AF se aprecia que las plantas con encapsulado + *B. subtilis* obtienen la media más alta con respecto a los demás tratamientos, presentando diferencias con las plantas control. Luna Martínez *et al.* (2013), mencionan que las bacterias del género *Bacillus* incrementan la biomasa de las plantas, ya que, a los 30 días de evaluación encontró que la cepa MA06 (*B. megaterium*) y MA12 (*B. subtilis*) reflejan mayor AP con 12.21 cm y 3.72 mm en el DT, dichos datos son inferiores a los que se presentan en este trabajo de investigación, esto podría deberse a que, los métodos de inoculación fueron diferentes en ambos trabajos, así como las variedades empleadas y condiciones del invernadero. Para la variable LR, podemos apreciar que las plantas con encapsulado + *B. subtilis* registran una media de 33.25 cm, con una diferencia de 8.25 cm con respecto a

las plantas control, mientras que, las plantas con MKP libre + *B. subtilis* presenta datos similares a las plantas con encapsulado + *B. subtilis*, existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre las plantas control, tal y como se puede observar en la Tabla 2. Las plantas que están inoculadas con la bacteria tuvieron mayor crecimiento radicular, esta información concuerda con Angulo *et al.* (2014), donde mencionan que la aplicación de bacterias del género *Bacillus* en plántulas de *Eucalyptus nitens* incrementó el crecimiento radicular hasta un 45% con respecto a las plantas control y también confirma con el comportamiento de esta cepa de *B. subtilis* LPM1 en diferentes especies de plantas al incrementar la biomasa radicular.

Para las variables: peso fresco de la hoja (PFH), peso fresco del tallo (PFT) y peso fresco de raíz (PFR), podemos apreciar en la Tabla 2, que para las tres variables se manifiestan diferencias estadísticamente significativas, siendo las plantas tratadas con encapsulado + *B. subtilis* la que presenta medias más altas en dichas variables. Seguido del tratamiento MKP + *B. subtilis*, dejando las plantas sin P con los valores más bajos. La tendencia que se ha estado observando, es que las plantas tratadas con nanofertilizante + bacterias son las que presentan mejores valores, por lo que se podría estar presentando algún efecto sinérgico o aditivo entre el nanofertilizante encapsulado y la bacteria. Los fertilizantes encapsulados tienen como objetivo liberar el mineral en una velocidad lenta y continua, de tal manera, que esté disponible por más tiempo en el medio para el aprovechamiento de las plantas (Messa *et al.*, 2016). Como se menciona anteriormente, al encapsular el mineral puede estar favoreciendo los resultados del tratamiento 4. Martínez *et al.* (2012), al aplicar *B. subtilis* como producto comercial BIOBAC a una dosis de 0.37mL/cavidad, encontraron mayor peso fresco aéreo de las plantas de tomate con un valor de 1.30 g/planta superando significativamente a las plantas testigo, dichos datos por el autor concuerdan con los valores obtenidos en este trabajo de investigación.

Los parámetros de peso seco de la hoja (PSH), peso seco del tallo (PST) y peso seco de raíz (PSR) que corresponden a la biomasa seca de las plantas, se aprecia

en la Tabla 2 que las plantas tratadas con el nanofertilizante encapsulado + *B. subtilis* (4), son las que obtuvieron las medias más altas en las tres variables, logrando detectar una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos, dejando en último lugar las plantas testigo (1). Sheng *et al.* (2008) demostraron que al inocular el suelo con *B. subtilis* vivas y muertas, los tejidos secos y raíces del tomate aumentaron en un 24 y 59% respectivamente, en el suelo inoculado con bacterias vivas en comparación con el suelo inoculado con bacterias muertas. La información que proporciona dicho autor va con la similitud de los resultados obtenidos en este experimento. Entonces, con esta primera evaluación de parámetros que corresponde a los 15 DDT, se observó que los tratamientos sobresalientes son aquellos que están combinados con la rizobacteria promotora del crecimiento vegetal.

Tabla 2. Variables de crecimiento del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) tratadas con nanofertilizante de fósforo encapsulado con almidón, MKP libre, con almidón solo y colonizadas por *B. subtilis*.

Trat	NH	AP (cm)	DT (mm)	AF (cm ²)	PFH (g)	PFT (g)	PFR (g)	LR (cm)	PSH (g)	PST (g)	PSR (g)
1	6.00 b	13.25 c	3.33 b	116.48 c	4.98 c	1.3 b	5.65 c	25.00 c	0.75 c	0.11 c	0.30 b
2	7.00 a	16.75 a	4.75 a	227.33 b	8.63 b	3.00 a	7.89 b	31.50 b	1.17 b	0.22 b	0.41 ab
3	6.75 ab	15.75 a	4.90 a	260.82 ab	9.33 ab	2.87 a	8.58 ab	29.25 abc	1.21 b	0.21 b	0.41 ab
4	6.50 ab	17.00 a	4.98 a	287.65 a	10.88 a	3.35 a	10.62 a	33.25 a	1.48 a	0.26 a	0.52 a
5	6.25 ab	14.25 b	5.03 a	239.47 ab	9.19 b	2.64 a	9.09 ab	27.50 bc	1.23 b	0.19 b	0.44 a
C.V%	8.43	9.92	9.32	15.49	12.52	19.94	21.07	12.57	12.07	13.53	19.74

Datos de la primera evaluación que corresponden NH= número de hojas AP= altura de la planta, DT= diámetro del tallo, AF=área foliar, PFH=peso fresco de la hoja, PFT=peso fresco del tallo y PFR= peso fresco de la raíz, LR=longitud de raíz, PSH=peso seco de la hoja, PST= peso seco del tallo y PSR= peso seco de raíz. 1) Plantas sin P. 2) Plantas con MKP+B.s. 3) Plantas con MKP. 4) Plantas con encapsulado+B.s y 5) Plantas con encapsulado. Medias con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo al LSD ($p \leq 0.05$).

Para determinar la liberación del fósforo encapsulado de una manera indirecta, se determinó el porcentaje de los elementos N, P y K. En la Figura 9, podemos observar el estado nutricional de las plantas, apreciamos que el porcentaje de N fue similar en las plantas tratadas con el MKP libre y el encapsulado con o sin bacterias, mientras que, las plantas sin P se alcanzan observar que el porcentaje de este mineral fue menor. Sin embargo, para el caso del P se muestra que en las plantas tratadas con el encapsulado con o sin bacterias tienen mayor concentración de dicho mineral que en el resto de los tratamientos. Para el caso del K, se observa que en los cinco tratamientos tuvieron un valor similar. Con los resultados que se obtuvieron en el primer muestreo en cuanto al estado nutricional de las plantas, podemos observar que en el porcentaje del P se nota una diferencia más clara en los tratamientos, no siendo así para los nutrientes N y K. La diferencia era de esperarse, ya que, el eje principal del trabajo es el P. En los tratamientos MKP libre + *B. subtilis* y MKP libre podemos observar que, a pesar de que el P estaba de manera libre y en mayor cantidad las plantas presentaron un menor contenido de este mineral en el tejido vegetal mientras que, en las plantas tratadas con el P encapsulado, se aprecia mayor concentración. Con los resultados mostrados, podemos determinar que el P encapsulado tiene mejor eficiencia de absorción en las plantas de tomate al igual que la aplicación de bacterias. Estudio realizado por Hurtado *et al.* (2007), reportan que al aplicar un microencapsulado de urea en comparación con un fertilizante libre, se obtiene mayor porcentaje del N y K en el tejido foliar de la gladiola. Estos datos coinciden para el caso del P de este trabajo de investigación, ya que, las plantas tratadas con el encapsulado acumularon mayor porcentaje del elemento P, aunque no se esté tratando de la misma especie vegetal.

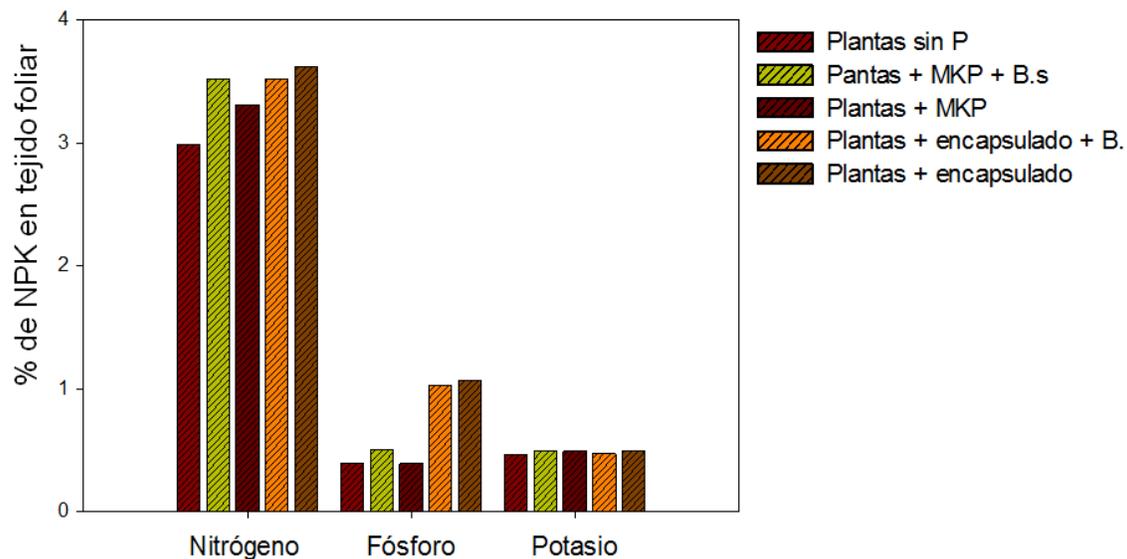


Figura 9. Porcentaje de NPK en el tejido foliar de las plantas de tomate a los 15 DDT. Tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial y *B. subtilis*.

Para la segunda evaluación de la promoción del crecimiento vegetal, podemos apreciar los resultados en la Tabla 3, valores correspondientes a los 30 DDT, en ella, podemos observar que para el NH y DT todos los tratamientos superaron al testigo (1), mientras que en el resto de los tratamientos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, datos que concuerda con la primera evaluación 15 DDT. Cabe mencionar que las plantas con mayor número de hojas fueron en las plantas tratadas con el encapsulado con un valor de 9, así como, en el DT con 6.73 mm, seguido de aquellas plantas que fueron tratadas con MKP libre + *B. subtilis*. Con estos resultados se respalda que el encapsulado, el MKP libre y la inoculación con bacterias no tuvieron un efecto negativo para estas dos variables. Sin embargo, Martínez *et al.* (2012), al evaluar estos mismos parámetros encontraron valores altos en plantas tratadas con la bacteria *B. subtilis* en comparación con el testigo y con ello diferencias estadísticamente significativas, estos datos son contrarios a los obtenidos en este trabajo de investigación. Hurtado *et al.* (2007), mencionan que, al aplicar un fertilizante de liberación lenta en el cultivo de gladiolo, provocó ligeros incrementos en el número

de hojas y diámetro del tallo (8.75%) con relación a la fertilización tradicional, esta información concuerda con los resultados de este trabajo de investigación.

Para la AP, AF y LR podemos observar las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, siendo mayor en plantas con nanofertilizante de P encapsulado + *B. subtilis*. Las plantas tratadas con MKP libre + *B. subtilis* obtuvieron una media de 35.50 cm en cuanto a la AP, datos similares a aquellos obtenidos en plantas tratadas con el nanofertilizante + *B. subtilis*. Sánchez-López *et al.* (2012), reportan mayor altura y diámetro del tallo en plantas de tomate al aplicar *Bacillus spp*, con esto, se demuestra que las bacterias promueven el crecimiento vegetal.

El peso fresco de la hoja, tallo y raíz, manifiestan la misma tendencia de las variables anteriores, en la Tabla 3 podemos observar que en estas tres mediciones los valores más altos se siguen presentando en las plantas con encapsulado + *B. subtilis* y las plantas tratadas con el encapsulado, con respecto a las plantas testigo. Con lo mencionado, se determina que al aplicar encapsulado y MKP libre comercial en combinación con bacterias ejercen un efecto positivo en las plantas e incluso al aplicar solamente el nanoencapsulado.

Para el peso seco de la hoja y raíz, las medias más altas se encontraron en las plantas tratadas con encapsulado con o sin *B. subtilis* en comparación con el testigo, existiendo una diferencia significativa entre tratamientos. Mientras que para el PST las plantas tratadas con MKP libre más bacterias obtuvieron un valor de 1.41 g, dato superior al resto de los tratamientos. Bustos *et al.* (2008), reportaron que al trabajar con un fertilizante de liberación controlada recubierto con una película de resina orgánica con nombre comercial de Osmocote en *Nothofagus dombeyi*, *Eucryphia cordifolia* y *Nothofagus nervosa* bajo diferentes dosis, encontraron que para la altura, peso seco del tallo, peso seco de las hojas, peso seco de raíces gruesas, peso seco de raíces finas, la dosis más alta de Osmocote (7.5 kg/m³) fue la que impacto de manera positiva en las variables de crecimiento, dichos datos son similares a los de este trabajo, ya que el fertilizante encapsulado obtuvo más ventajas sobre las variable evaluadas. También cabe

mencionar que las plantas tratadas con el encapsulado y MKP libre en combinación con la bacteria se encontraron resultados similares, ya que dichas bacterias están estudiadas y comprobadas de que ejercen un efecto positivo en la promoción del crecimiento vegetal a través de mecanismos como: liberación de fitohormonas, fijación de N, solubilización de nutrimentos, liberación de agentes quelantes y control de patógenos (Loredo-Osti *et al.*, 2004).

Tabla 3. Variables de crecimiento del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) tratadas con nanofertilizante de fósforo encapsulado con almidón, MKP libre, con almidón solo y colonizadas por *B. subtilis*.

Trat	NH	AP (cm)	DT (mm)	AF (cm ²)	PFH (g)	PFT (g)	PFR (g)	LR (cm)	PSH (g)	PST (g)	PSR (g)
1	6.75 b	25.75 b	4.05 b	171.19 c	6.48 c	3.65 c	7.84 c	23.75 b	1.13 c	0.42 c	0.49 c
2	9.25 a	35.50 a	6.33 a	623.94 b	28.98 ab	12.71 ab	25.75 ab	28.50 ab	3.46 ab	1.41 a	2.09 ab
3	8.50 a	30.25 b	6.13 a	585.54 b	26.67 b	10.43 b	21.58 b	28.00 ab	3.26 b	1.13 b	1.72 b
4	8.75 a	34.25 a	6.23 a	753.53 a	35.59 a	12.91 ab	28.89 a	33.25 a	4.04 a	1.37 ab	2.26 a
5	9.00 a	32.00 a	6.73 a	724.41 a	36.04 a	13.50 a	26.99 a	29.50 ab	4.11 a	1.37 ab	2.33 a
CV%	8.23	9.86	7.89	10.91	18.57	18.18	14.50	13.80	15.39	15.40	19.36

Datos de la segunda evaluación que corresponden al NH= número de hojas, AP= altura de la planta, DT= diámetro del tallo, AF=área foliar, PFH=peso fresco de la hoja, PFT=peso fresco del tallo y PFR=peso fresco de raíz, LR=longitud de raíz, PSH=peso seco de la hoja, PST=peso seco del tallo y PSR= peso seco de raíz. 1) Plantas sin P. 2) Plantas con MKP+B.s. 3) plantas con MKP. 4) Plantas con encapsulado+B.s y 5) Plantas con encapsulado. Medias con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$)

Para la segunda evaluación del estado nutricional de las plantas, podemos observar en la Figura 10, que las plantas sin P son las que obtuvieron menor concentración de P y N, mientras que, las plantas tratadas con el P libre con o sin bacterias muestran un comportamiento similar para los tres nutrientes evaluados. Sin embargo, aquellas plantas tratadas con el encapsulado se siguen apreciando con mayor cantidad de P en el tejido foliar. En la literatura se ha mencionado que los encapsulados tienen la función de liberar el mineral de una manera más lenta y continua, de tal manera que, siempre esté disponible para las plantas y así mismo, reducir las pérdidas del fertilizante. Estudios realizados por Jarosiewicz y Tomaszewska (2003), mencionan que las propiedades físicas de los recubrimientos influyen en la tasa de liberación de macronutrientes que están presentes en el núcleo del fertilizante recubierto. Este mismo autor, al recubrir el fertilizante granular comercial NPK 6-20-30 con poliacrilonitrilo (PAN) con 60.45 % de porosidad, preparado a partir de una solución de polímero al 16 %, se liberó el 100 % de NH_4^+ y P_2O_5 después de 4 h de prueba y el 99.7 % de K^+ después de 5 h de prueba, mientras que en el caso de recubrimiento con 48.8 % de porosidad, se liberó 31.8 % de NH_4^+ , 16.7 % de P_2O_5 y 11.6 % de K^+ después de 5 h. Aunque en este trabajo de investigación no se evaluó la liberación del fósforo de una manera directa, con los resultados obtenidos de este trabajo, podemos observar que, el encapsulado mostró ser mejor de este mineral en el tejido foliar y con esto se asume que hubo una liberación más lenta con menor pérdida de mineral, ya que los resultados del contenido nutrimental en el tejido foliar lo reflejan así.

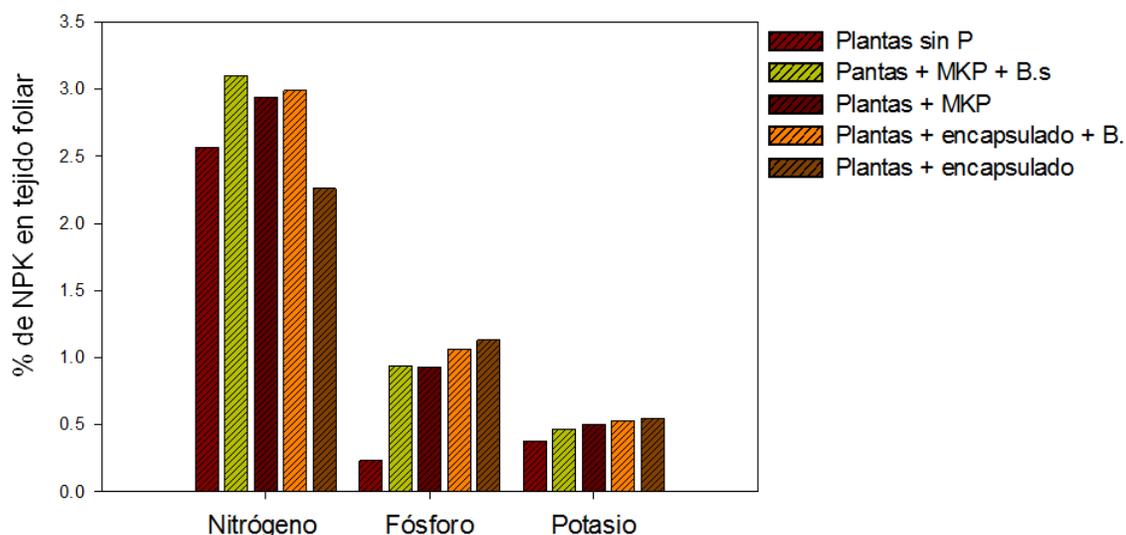


Figura 10. Porcentaje de NPK en el tejido foliar de las plantas de tomate a los 30 DDT tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial y *B. subtilis*.

Dentro de los parámetros fisiológicos evaluados en la Figura 11, se muestra el efecto de la inoculación con *B. subtilis* y la aplicación del nanofertilizante en diferentes variables fisiológicas del crecimiento de las plantas de tomate como la fotosíntesis, conductancia estomática y transpiración. Las diferentes variables fueron analizadas a los 21 días después de la inoculación con la bacteria *B. subtilis*. El registro de las variables fue realizada a las 12 horas del día. En la Figura 11 se puede observar que en los tres parámetros evaluados todos los tratamientos superaron el control.

La baja tasa fotosintética en el control, se debe a que las plantas, al no tener fósforo presentaron síntomas de deficiencia en las hojas tomando un color purpura, como una forma de manifiesto a la deficiencia del P y como bien se sabe, es un mineral que interviene en la formación de ATP, fosfolípidos en membranas y forma parte de los ácidos nucleicos, todo lo anterior interviene en la fotosíntesis, es por ello que las plantas control tuvieron este comportamiento diferente al resto de los tratamientos.

Al presentarse diferencias estadísticamente significativas en el testigo con el resto de los tratamientos, se muestra que, en la transpiración tanto como en la conductancia estomática en aquellas plantas tratadas con el encapsulado, MKP libre con o sin

bacterias, presentan las mismas tendencias, así como, en el parámetro de la fotosíntesis y, esta similitud nos puede indicar que las plantas no fueron sometidas bajo ningún estrés nutricional ni riego que pueda haber afectado los tratamientos.

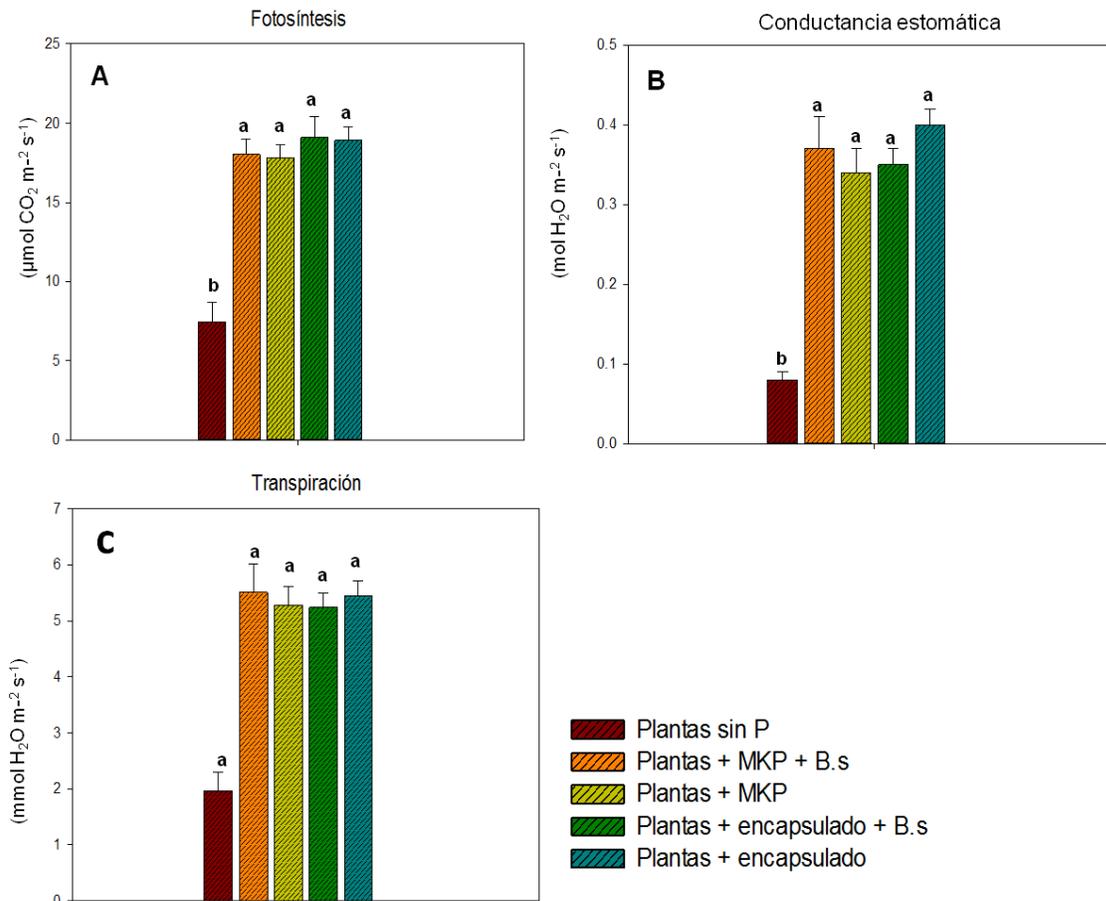


Figura 11. Medición de parámetros fisiológicos: A) Fotosíntesis. B) Conductancia estomática y C) Transpiración en plantas de tomate tratadas con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, *B. subtilis* y almidón de maíz. Medias ± E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).

VI. 2. Bioensayo realizado en primavera-verano del 2018.

Durante este experimento se realizaron tres análisis destructivos a diferentes tiempos que corresponden: a los 15 DDT (M1), 30 DDT (M2) y 45 DDT (M3). Para este caso se incluyó como control el almidón de maíz empleado como matriz encapsulante.

VI. 2. 1. Número de hojas.

Como puede observarse en relación al número de hojas en la Figura 12, para el M1 no se tienen diferencias significativas en los seis tratamientos, mientras que, en el M2, se logran detectar que las plantas sin P registran valores más bajos. Lo mismo pasa para el último muestreo, los valores más bajos se presentan en las plantas sin P, mientras que, para el resto no difieren para esta variable. En el M3 se alcanza a apreciar que las plantas sin P presentaron defoliación. Aunque no se detectan diferencias significativas entre los tratamientos, podemos observar que las plantas inoculadas con la bacteria *B. subtilis* registran medias ligeramente altas. Comparando estos datos con los obtenidos por Martínez *et al.* (2012), reportan un valor de 4.1 hojas a los 21 días de la siembra esto al aplicar *B. subtilis* con nombre comercial BIOBAC a una dosis de (0.37ml/cavidad) mostrando el efecto de la bacteria. Con los datos de ambos trabajos, podemos ver la actuación de las bacterias de manera benéfica, considerando que para este experimento las plantas evaluadas fueron a los 45 días después de la germinación.

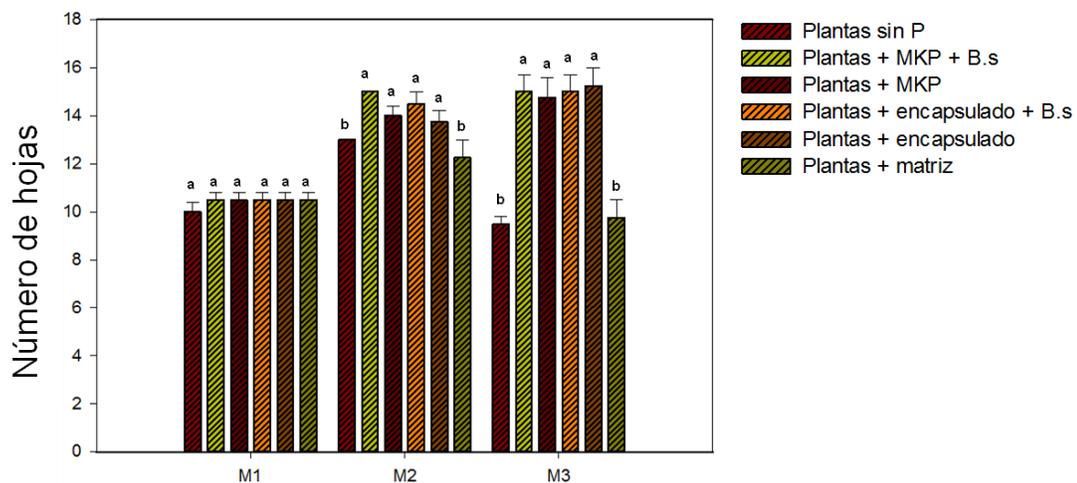


Figura 12. Número de hojas (NH) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, *B. subtilis* y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).

VI. 2. 2. Altura de las plantas.

En la Figura 13 se aprecian los valores de la altura de las plantas, en ella se puede ver diferencias significativas desde el primer muestreo, donde las plantas tratadas con MKP libre + *B. subtilis* y encapsulado + *B. subtilis* numéricamente son las más destacadas con respecto al resto de los tratamientos, aunque solo el tratamiento con MKP + *B. subtilis* resultó significativo para los otros tratamientos. La misma tendencia ocurre para el muestreo 2, mientras que para el muestreo 3, el tratamiento 4 (encapsulado + *B. subtilis*) obtuvo una mejor respuesta. Con este parámetro se sigue conservando que las plantas tratadas con *B. subtilis* ya sea con el encapsulado o MKP libre, ejercen un efecto positivo en el crecimiento de las plantas de tomate. Estudios realizados por Solanki *et al.* (2015) al evaluar a los 45 días el efecto del *Bacillus subtilis* (MB14) y *Bacillus amyloliquefaciens* (MB101) solas y en combinación con *R. zolani* en tomate, encontraron que la altura más alta se registró en el tratamiento MB101 con un valor de 39 cm, seguido del MB14 35 cm e incluso en plantas que fueron tratadas con *R. zolani*, estos datos son inferiores a los que se reportan en este trabajo de investigación, destacando la participación del encapsulado.

Relacionando los datos que se obtuvieron en este trabajo de investigación y con los que obtuvo Solanki *et al.* (2015), se ha demostrado que, en efecto, las plantas que son inoculadas con *Bacillus spp*, se observa una promoción del crecimiento vegetal, pero también, se ha encontrado que la aplicación de un microencapsulado de N, da un plus en el crecimiento de las plantas, esto lo demuestra Hurtado *et al.* (2007), al evaluar la altura en plantas de *Gladiolus spp.* variedad Rosado encontraron mayor altura (97.88 cm) en las plantas crecidas con el microencapsulado a diferencia con el fertilizante sin encapsulación (84.53 cm) datos que concuerdan con este trabajo. En los tres muestreos se observa que no hubo mucha variación de los tratamientos con respecto a las plantas sin P y tratadas con la matriz de almidón, esto probablemente, las plantas al carecer del elemento P tienden a alargar los tallos como un escape al estrés, las plantas se enfocan en alargar el tallo y no en producir hojas y con ello alcanzando

mayor altura.

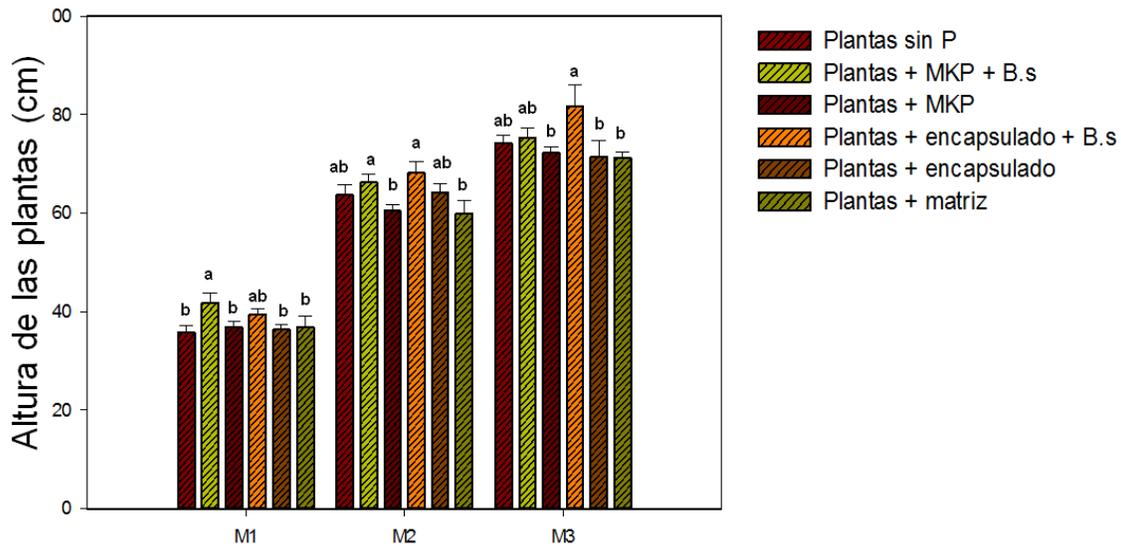


Figura 13. Altura de las plantas (AP) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, *B. subtilis* y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).

VI. 2. 3. Área foliar.

Las diferencias entre tratamientos de la variable área foliar se plasman en la Figura 14, observándose que en el M1 (15 DDT), las plantas tratadas con MKP + *B. subtilis*, MKP libre, encapsulado + *B. subtilis* y encapsulado superaron a las plantas sin P y plantas tratadas con la pura matriz, siendo significativos. Para el M2 (30 DDT) no hubo ningún cambio en esta variable con respecto al primer muestreo, las diferencias se destacan a los 45 DDT, donde se puede apreciar que las plantas tratadas con encapsulado registran valor más alto, que el resto de los tratamientos. A los 45 días se puede observar que las plantas sin P y plantas con la matriz detuvieron su crecimiento. Con los datos de este parámetro, se sigue destacando que las plantas tratadas con MKP libre o encapsulado en combinación con la bacteria podrían estar ejerciendo un efecto positivo en crecimiento de las plantas. Zhang *et al.* (2014), reportan que al encapsular el nitrato de potasio (KNO_3) con películas de óxido de grafeno las características de liberación lenta del fertilizante mejoraron drásticamente y mencionan que puede ser una gran promesa para el desarrollo de fertilizantes de liberación

controlada ambientalmente benéfico para los cultivos. Con este trabajo de investigación podemos decir que, efectivamente la encapsulación del fertilizante beneficia el crecimiento de las plantas, ya que, a pesar de que contenía menor cantidad de P las variables de crecimiento fueron similares a las tratadas con MKP libre. Por otro lado, Flores *et al.* (2018), al evaluar un producto comercial de SUPERBAC M-90 que contiene *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* y *Trichoderma harzianum* a una dosis de 0, 1, 2 y 4 L/ha reporta un valor entre 2000 y 2500 cm² de área foliar a los 62 DDT favoreciendo las dosis 2 y 4, dichos datos son inferiores a los de este trabajo de investigación, esto nos permite mostrar el plus del nanofertilizante de P encapsulado, aunque la aplicación del MKP también registra valores superiores.

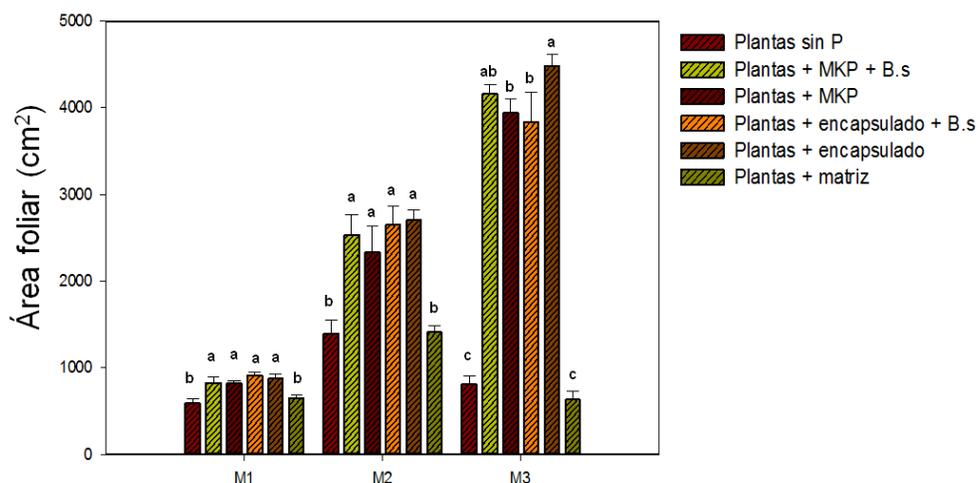


Figura 14. Área foliar (AF) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, *B. subtilis* y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).

VI. 2. 4. Diámetro del tallo.

Dentro de los resultados que corresponden a la variable del diámetro del tallo, en la Figura 15 del M1 se observa que todos los tratamientos no presentaron diferencias estadísticas. Sin embargo, para el M2 se logra observar que las plantas tratadas con MKP libre con o sin bacterias, son los que alcanzaron valores altos, seguido de las plantas tratadas con encapsulado con o sin bacterias, ocupando el último lugar las plantas sin P. Mientras que, en el M3 se observa que se sigue la misma tendencia con

respecto a los dos primeros muestreos, encontrando los valores más bajos en las plantas sin P, mientras que en el resto de los tratamientos ya no se presentaron diferencias estadísticamente significativas. Los valores de esta variable indican que al aplicar un fertilizante encapsulado que tiene la función de una liberación lenta y en una concentración menor que el MKP comercial obtiene resultados similares o en algunas variables son mejores en comparación con el MPK libre sin encapsular. Estudios que han evaluado la encapsulación de fertilizantes con una matriz a base de almidón de papa, demuestran tener una liberación lenta, considerando una forma para mejorar la efectividad de los fertilizantes (Qiao *et al.*, 2016). Arriaga *et al.* (2009), al inocular las plantas de *Lilium sp.* con *B. subtilis* comparando con un testigo (plantas sin *B. subtilis*), reportan que el diámetro de las plantas inoculadas fue de 8.1 mm, mientras que el testigo alcanzó 8.5 mm, aunque no estemos trabajando con la misma especie vegetal, estos datos comparando con los de este trabajo de investigación, se destaca que hay una similitud, ya que, en el primer y tercer muestreo las plantas inoculadas con *B. subtilis* y sin *B. subtilis* no presentaron diferencias estadísticamente significativas. Martínez (2018), al evaluar un microfertilizante de fósforo encapsulado con cera de candelilla en comparación con un fósforo libre (MKP) en plantas de tomate, reporta no haber encontrado diferencias en el diámetro del tallo, datos similares para este trabajo.

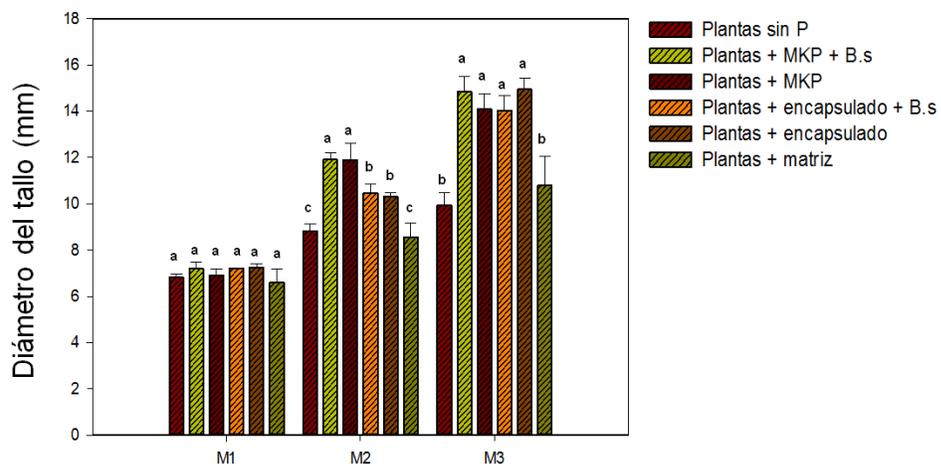


Figura 15. Diámetro del tallo (DT) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, *B. subtilis* y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).

VI. 3. Variables de crecimiento vegetal que corresponden a la biomasa fresca.

La biomasa es aquella materia orgánica de origen vegetal que se obtiene pesando las partes que conforman una planta, tales como: hoja, tallo y raíz. Son parámetros que nos indican de manera general el desarrollo de las plantas y para nuestro propósito constituye una herramienta para detectar diferencias en la promoción de crecimiento por la aplicación de los tratamientos.

VI. 3. 1. Peso fresco de la hoja.

En la Figura 16 podemos percibir los resultados del peso fresco de la hoja, donde se puede distinguir, que en los tres muestreos, todos los tratamientos superan a las plantas sin P. Aunque en las plantas tratadas con el MKP libre o encapsulado con o sin bacterias no muestren diferencias significativas, se puede apreciar que, la media más destacada se registra en las plantas tratadas con el encapsulado o MKP libre en combinación con la bacteria *B. subtilis*. Con estos datos obtenidos se detecta que a pesar de que el MKP está encapsulado y en una baja proporción de P, las plantas tienen la misma respuesta con respecto a la aplicación del P de manera libre y en mayor cantidad.

Si bien, ya se conoce la función de un fertilizante encapsulado, es también de reconocer que, durante años se ha trabajado con nanomateriales en la medicina, ciencia ambiental, etc, ha sido exitoso. Sin embargo, en la agricultura es poco explorado, pero con los estudios ya realizados, demuestran que son capaces de mejorar la germinación de semillas, la protección de plantas y detección de patógenos (Khot *et al.*, 2012). Por otra parte, las bacterias también han tenido una contribución importante en la promoción del crecimiento vegetal para este trabajo de investigación. Aunque en la mayoría de las variables evaluadas no se muestran diferencias significativas con respecto a las plantas inoculadas y no inoculadas, pues cabe destacar que las medias más altas son en aquellas plantas inoculadas con la bacteria *B. subtilis*.

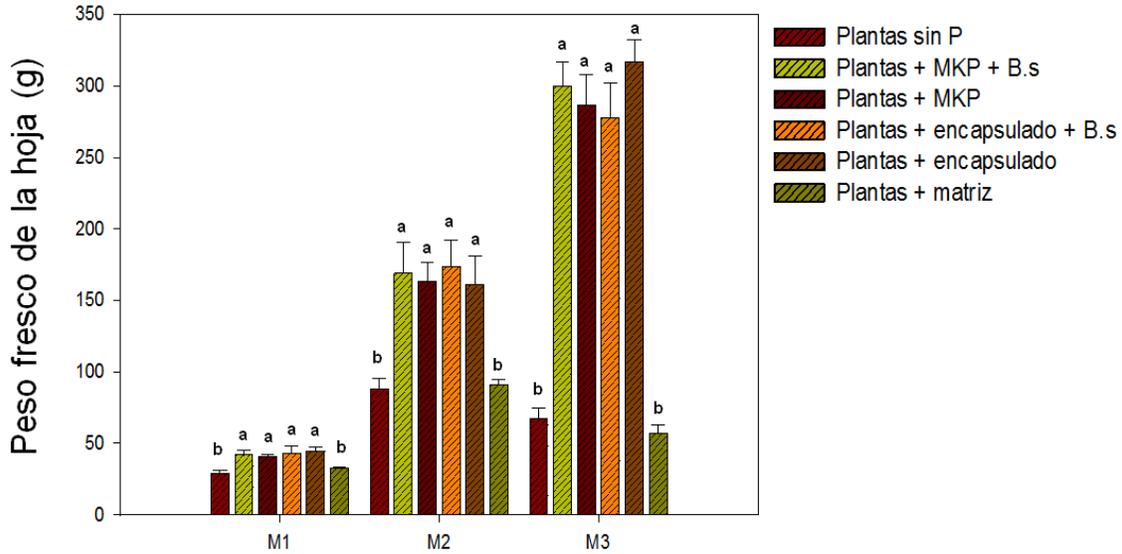


Figura 16. Peso fresco de la hoja (PFH) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, *B. subtilis* y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).

VI. 3. 2. Peso fresco de la raíz.

Para el peso fresco de la raíz, se puede destacar que, en la primera evaluación, las plantas tratadas con el encapsulado + *B. subtilis* y las plantas tratadas con MKP libre + *B. subtilis* son las que registran medias más altas existiendo diferencias significativas entre los tratamientos. La tendencia cambia para los dos últimos muestreos, ya que las plantas tratadas con MKP libre + *B. subtilis*, encapsulado + *B. subtilis* y encapsulado son las que resaltan numéricamente, aunque no exista diferencias significativas del tratamiento 2 al 5, las plantas sin P o con la pura matriz siempre manifiestan diferencias con el resto de los tratamientos (Fig. 17), con estos resultados se sigue observando que las plantas tratadas con la bacteria o encapsulado resultan ser benéficos en el crecimiento y desarrollo de las mismas. Zaidi *et al.* (2006), reporta el peso fresco de las raíces en *Brassica juncea* con un valor de 8.0 ± 1.3 g al inocular las plantas con *B. subtilis* y 7.0 ± 0.2 g en plantas testigo a los 140 días de post-siembra en cultivo en macetas. Aunque no se trabajó con la misma especie de planta, se logra apreciar que las bacterias estimulan el desarrollo de las raíces de las plantas, esta información concuerda con los resultados obtenidos de este trabajo.

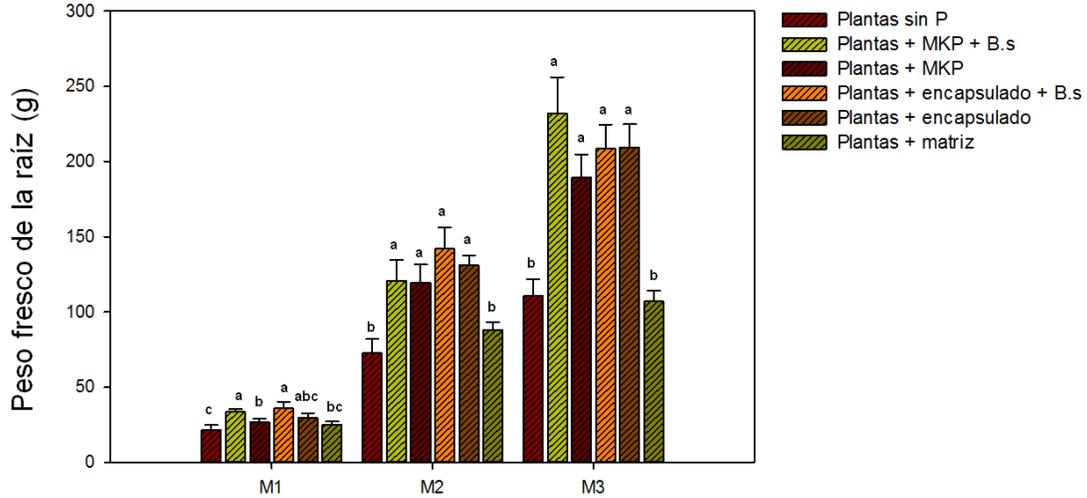


Figura 17. Peso fresco de la raíz (PFR) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, *B. subtilis* y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).

VI. 3. 3. Peso fresco del tallo.

Los datos del peso fresco del tallo, indican que las plantas tratadas con el MKP libre y encapsulado en combinación con bacterias tienen medias más altas. Sin embargo, no existe diferencia entre los tratamientos, esto para el M1. En el M2 y M3 se observa que las plantas sin P y tratadas con la pura matriz, son las que presentaron menor peso en comparación con las plantas tratadas con MKP libre + *B. subtilis*, MKP, encapsulado + *B. subtilis* y encapsulado (Fig. 18). Con los datos mostrados en la Figura 16 se resalta que el encapsulado, está cumpliendo con su función, así como la participación de las bacterias. Flores *et al.* (2018) al aplicar un producto comercial SUPERBAC M-90 a una dosis de 0, 1, 2 y 3 L/ha no encontró diferencias estadísticamente significativas para el peso fresco del tallo en el cultivo de tomate, información que concuerda con este trabajo de investigación.

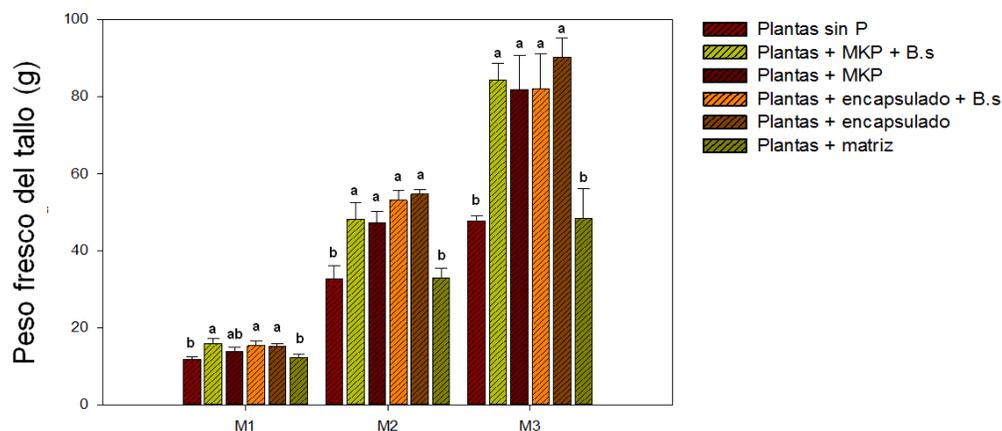


Figura 18. Peso fresco del tallo (PFT) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, *B. subtilis* y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).

VI. 3. 4. Peso fresco total.

De manera resumida, en la Figura 19 se puede apreciar el peso fresco total aéreo, mostrando que, para los tres muestreos, aquellas plantas sin P y tratadas con la matriz sola, obtienen los valores más bajos que el resto de los tratamientos. Entonces, de manera general, se resalta que la plantas con MKP libre o encapsulado con o sin bacterias tienen una respuesta similar, aun cuando la proporción de P encapsulado sea menor en comparación con el MKP libre.

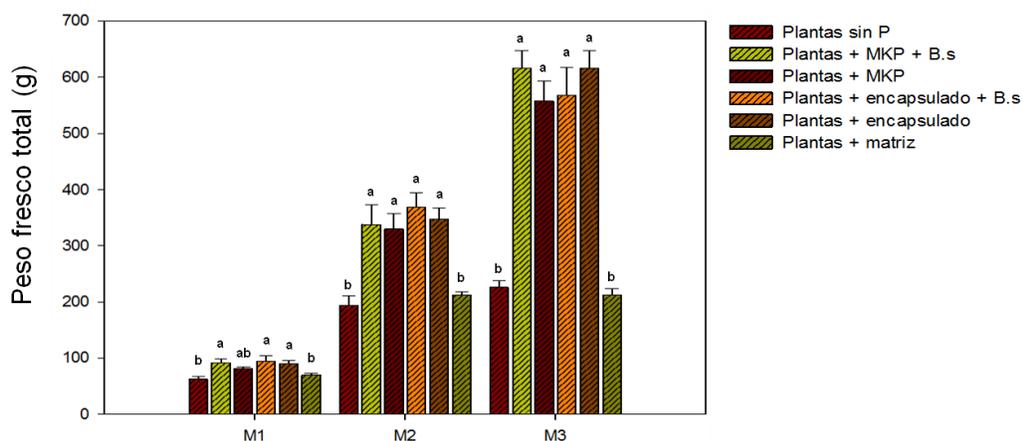


Figura 19. Peso fresco total (PFTot) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, *B. subtilis* y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).

VI. 4. Variables de crecimiento vegetal que corresponden a la biomasa seca.

De las siguientes figuras se muestran el peso seco de cada parte de la planta, son datos que se obtienen una vez que las plantas pierden agua en el tejido.

VI. 4. 1. Peso seco de la hoja.

De acuerdo a la Figura 20 se puede destacar que para el PSH en los seis tratamientos del primer muestreo no presentan diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, en la segunda y tercera evaluación se aprecia que las plantas tratadas con MKP + *B. subtilis*, MKP, encapsulado + *B. subtilis* y encapsulado superaron de manera significativa a las plantas sin P y plantas tratadas con la matriz de almidón. Al no presentarse diferencias en los tratamientos 2, 3, 4, 5 indica que las plantas con MKP encapsulado con o sin bacterias con una proporción menor de P, intervienen de manera similar en el crecimiento de las plantas con respecto a las plantas que tienen MKP libre y en mayor cantidad de P. Los fertilizantes encapsulados que se le denomina también como, fertilizantes de liberación lenta proporcionan a la planta una nutrición más uniforme, equilibrada, con lo que se reducirá el riesgo de excesos y deficiencias nutricionales, así como reducir la frecuencia de aplicación (Recasens, 2008).

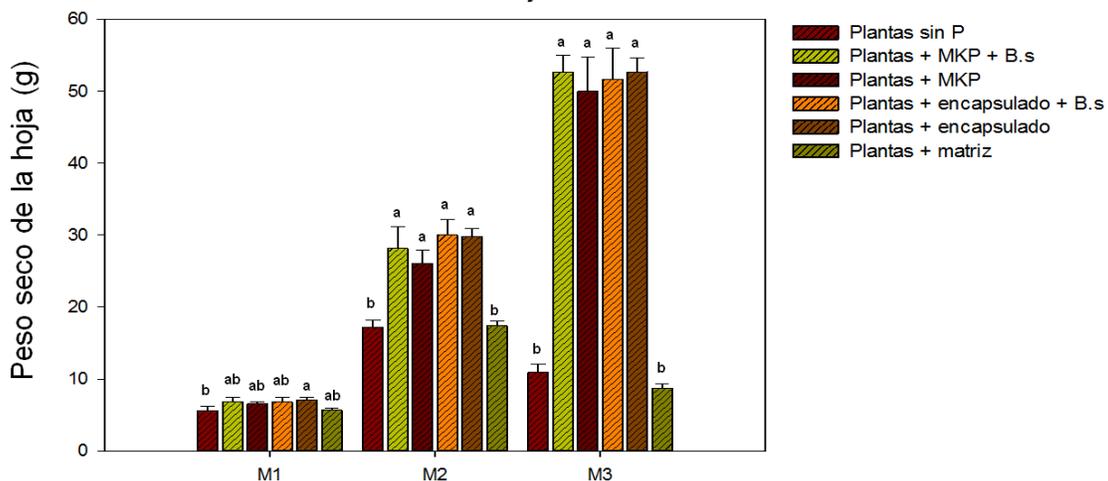


Figura 20. Peso seco de la hoja (PSH) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, *B. subtilis* y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).

VI. 4. 2. Peso seco de la raíz

Con respecto al peso seco de la raíz, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el M1. Para el M2 se observa que los tratamientos 4 y 5 que tienen encapsulado son superiores numericamente. Para el M3 las plantas sin P y plantas con la matriz son los que tuvieron menor biomasa de raíz con respecto al resto de los tratamientos que tuvieron un comportamiento similar, podemos observar que las plantas tratadas con el encapsulado y MKP libre con o son bacterias tienen efecto similar en el PSR (Fig. 21). Mena-Violante y Olalde-Portugal (2007), al evaluar plantas de tomate inoculadas con la bacteria *Bacillus subtilis* y no inoculadas en dos experimentos reportan un valor de 8.6 g de PSR en el primer experimento y 7.8 g en el segundo, mientras que, en las plantas sin inocular fue de 6.8 g y 5.9 g resultados que obtuvieron a los 50 DDT, dichos datos son inferiores a los resultados de este trabajo de investigación para el M3, mostrando que la aplicación de bacterias y/o encapsulado hay un ligero incremento en el PSR.

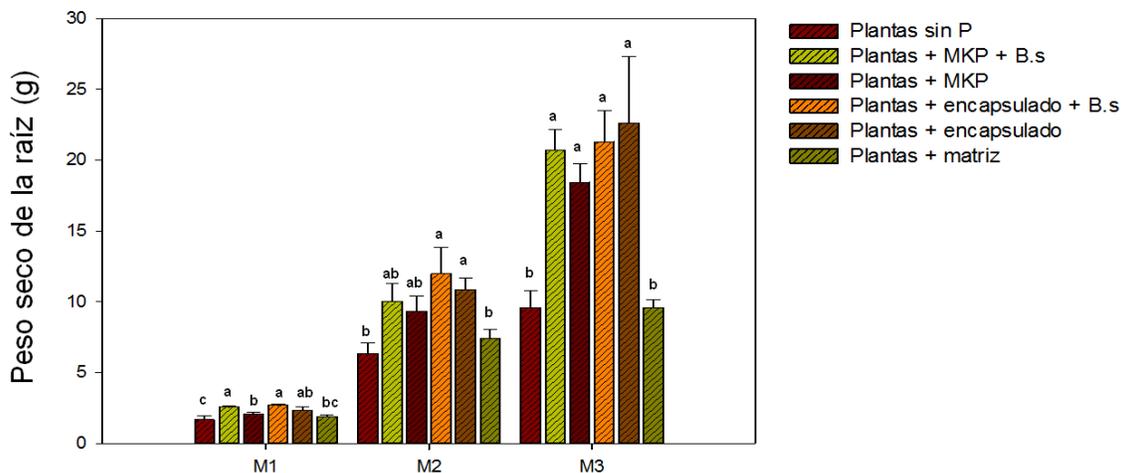


Figura 21. Peso seco de la raíz (PSR) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, *B. subtilis* y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).

VI. 4. 3. Peso seco del tallo.

Para el peso seco del tallo, se puede observar que en el M1 no se encontraron diferencias significativas, caso contrario para el M2 donde se puede destacar que las plantas tratadas con MKP libre, nanoencapsulado con o sin *B. subtilis* superaron a las plantas sin P y plantas con la matriz. Sin embargo, numéricamente los tratamientos con encapsulado resultan ser mejores. Mientras que, para el último muestreo, todos los tratamientos superaron a las plantas sin P y tratadas con la matriz, aunque dichos tratamientos tuvieron un comportamiento similar entre ellos, destacando que el MKP encapsulado tiende a tener valores un poco más altos o igualar a las plantas tratadas con MKP libre con o sin bacterias (Fig. 22). Flores *et al.* (2018), reportan que, a los 107 DDT del cultivo de tomate, las plantas testigo (sin inocular) alcanzaron mayor peso seco en el tallo, que en plantas tratadas con SUPERBAC M-90, estos datos son contrarios a los de este trabajo, ya que, en este trabajo el PST es similar en todos los tratamientos, excepto en aquellas plantas sin fósforo.

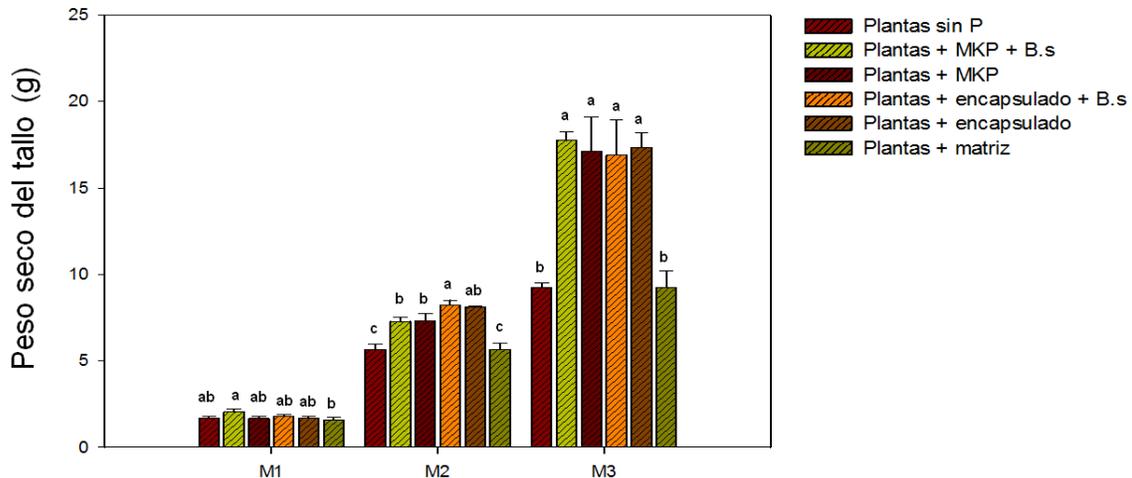


Figura 22. Peso seco del tallo (PST) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, *B. subtilis* y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).

VI. 4. 4. Peso seco total.

En la Figura 23 podemos observar de manera general el PSTot de la parte aérea de las plantas del M1 y en ella, apreciar que las plantas tratadas con MKP libre y encapsulado en combinación con bacterias tienen valores ligeramente altos con respecto al resto de los tratamientos, aunque no se presentan diferencias significativas. Mientras que para el muestreo 2 y 3 todos los tratamientos superan a las plantas sin P, así como, las plantas tratadas con matriz, pero se puede observar que, a pesar de que no exista diferencias significativas en los tratamientos, aquellas plantas tratadas con MKP libre, encapsulado con o sin bacterias sobresalen en los parámetros evaluados. La bacteria *Bacillus subtilis* puede promover el crecimiento vegetal en diferentes especies, tal es el caso de Arriaga *et al.* (2009), que al trabajar con *Lilium sp*, reportaron un mayor peso aéreo en las plantas inoculadas con *B. subtilis* que en el testigo. También cabe destacar la participación del nanofertilizante de P encapsulado, ya que, según Recasens (2008), los nutrientes se liberan de forma lenta por la presión osmótica y el nanofertilizante de P por su tamaño incrementa el contacto superficial con la raíz de las plantas. Por otro lado, reportan que, la eficiencia agronómica del P aplicada como fertilizantes de liberación lenta es de 3 a 13 % mayor que el MAP sin recubrimiento en plantas de maíz (Teixeria *et al.*, 2016).

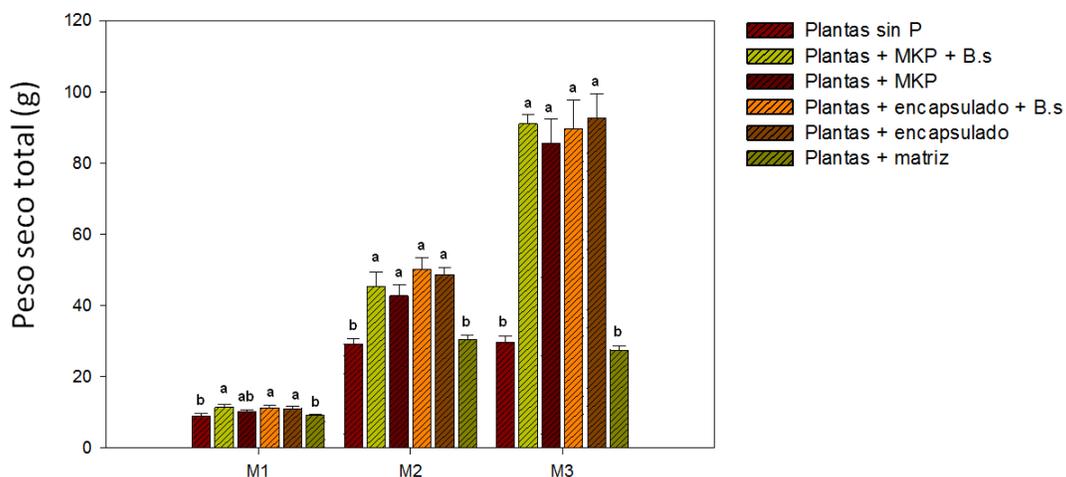


Figura 23. Peso seco total (PSTot) del cultivo de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, *B. subtilis* y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).

VI. 5. Contenido de macronutrientes N, P y K en el tejido foliar y radical de las plantas de tomate.

Las plantas evaluadas durante el primer muestreo y el tercer muestreo se mandaron a analizar para determinar el contenido de macronutrientes en el tejido foliar y radicular de las plantas, con la finalidad de comparar de una manera indirecta, cómo fue la absorción del elemento P encapsulado y de manera libre por las plantas, de esta manera relacionar si hubo o no, una liberación del P encapsulado.

VI. 5. 1. Nitrógeno en el tejido foliar.

En la Figura 24 podemos observar el porcentaje del N total, donde se aprecia que, en las plantas tratadas con la matriz de almidón, plantas con el encapsulado, plantas con MKP libre con o sin bacterias obtienen valores más altos en comparación con las plantas sin P, existiendo diferencias estadísticamente significativas. En el tercer muestreo que corresponde a los 45 DDT la tendencia cambió con respecto al primer muestreo, ya que la concentración del N disminuyó. Sin embargo, a los 45 DDT no se encuentran diferencias significativas, pero el porcentaje más bajo del N se registra en las plantas sin P.

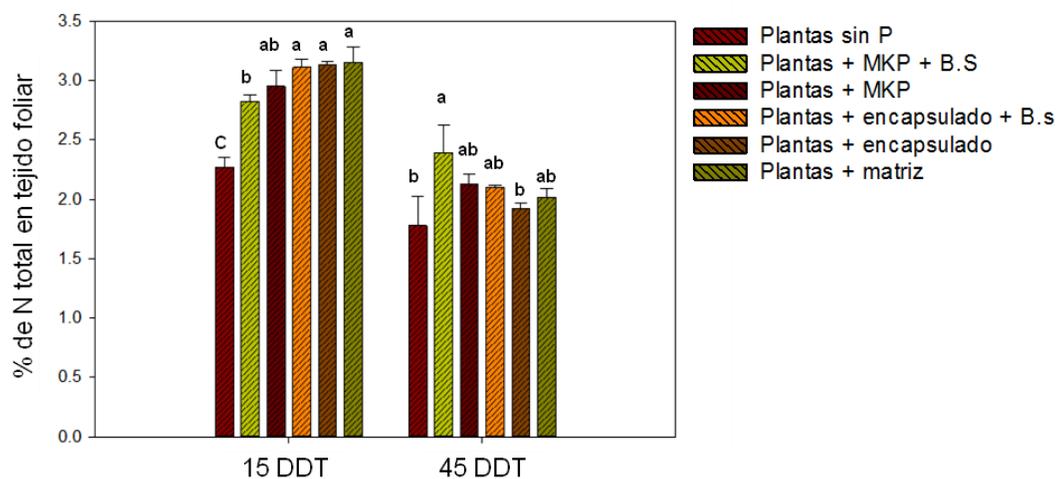


Figura 24. Porcentaje de nitrógeno (N) en el tejido foliar de las plantas de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, *B. subtilis* y almidón de maíz sin tratar. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).

VI. 5. 2. Fósforo en el tejido foliar.

Para el caso del P se puede observar claramente, que aquellas plantas sin P fueron las que presentaron menor contenido de dicho mineral. Mientras que, para las que fueron tratadas con el MKP libre y P encapsulado con o sin bacterias son las que obtuvieron mayor concentración del mineral en el tejido foliar, aunque numéricamente, fue menor en aquellas plantas tratadas con el encapsulado. A los 45 DDT podemos observar nuevamente que los valores más bajos se registraron en aquellas plantas sin P. Mientras que, el mayor contenido de P fue en los tratamientos con MKP libre con o sin *B. subtilis*, seguido de las plantas tratadas con el encapsulado, mostrando diferencias significativas entre plantas sin P, plantas con MKP libre y el encapsulado (Fig. 25). Con los resultados que se observan en la figura 25, de manera indirecta se puede determinar, que a pesar de que las plantas tratadas con el encapsulado presentaron menor concentración del fósforo en el tejido foliar, esto no afectó el crecimiento de las plantas, ya que, en la mayoría de las variables de crecimiento evaluadas tuvieron valores ligeramente más altos. Por otro lado, también se recalca que las plantas tratadas con el encapsulado recibieron menor cantidad de fósforo y es aquí, donde podemos citar las funciones del encapsulado como: mayor eficiencia, las pérdidas son menores, ahorro del fertilizante y disminuir la frecuencia de aplicación, así como, mayor disponibilidad de P en el suelo para las plantas al modificar el patrón de liberación (Teixeria *et al.*, 2016).

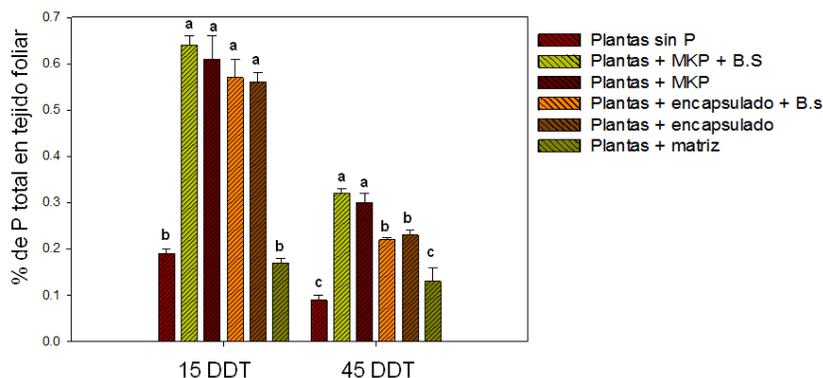


Figura 25. Porcentaje de Fósforo (P) en el tejido foliar de las plantas de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, *B. subtilis* y almidón de maíz sin tratar. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).

VI. 5. 3. Potasio en el tejido foliar.

En la Figura 26, podemos observar el porcentaje total del contenido de potasio (K), se puede apreciar que en los seis tratamientos mantuvieron un comportamiento similar para los dos muestreos, sin diferencias estadísticas. Con todo lo anterior, podemos observar que donde se encontraron diferencias significativas fue en el contenido del P y era de esperar estos resultados, ya que, el eje principal de este trabajo es el aplicar el P de manera libre y encapsulado en plantas colonizadas por rizobacterias. También es de destacar, que con los resultados que se muestran, podemos ver de manera general, que aquellas plantas tratadas con el encapsulado obtuvieron menor concentración del elemento P en el tejido foliar que en las plantas tratadas con el P libre (esto acorde a la relación real de almidón: MKP). Estudios realizados por Cole *et al.* (2016), al aplicar un fosfato monoamónico (MAP) en comparación con un fertilizante de liberación controlada, encontraron que el porcentaje de N en las hojas de tomate no difirió en sus tratamientos ni en plantas control, así mismo sucedió para el caso de del elemento P, mientras que, para el K encontraron mayor concentración en los tratamientos que en las plantas control, estos mismos autores mencionan que, el MAP agregó más P que el fertilizante de liberación controlada sin afectar la concentración del P en la hoja, comparando estos resultados con los de este trabajo de investigación, podemos observar que para los elementos N y K concuerdan. Sin embargo, para el caso del P, en este trabajo de investigación si se encontraron diferencias significativas y con menor concentración en plantas tratadas con el encapsulado. Con los resultados en este trabajo y resultados de otros autores se coincide que, en efecto, los fertilizantes encapsulados tienen una liberación lenta que cumplen la función de optimizar el uso del mineral.

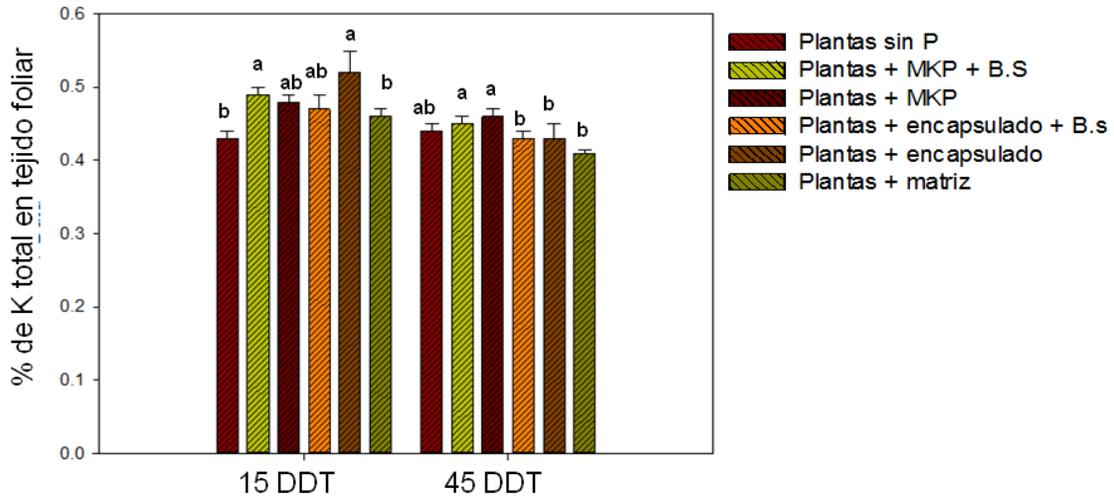


Figura 26. Porcentaje de potasio (K) en el tejido foliar de las plantas de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, *B. subtilis* y almidón de maíz sin tratar. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).

VI. 5. 4. Nitrógeno en el tejido radicular.

En relación al porcentaje total de N en el tejido radicular, se puede observar que a los 15 DDT el contenido de N no tuvo diferencias, puesto que, en los 6 tratamientos mantuvieron un comportamiento similar. Para el tercer muestreo, que corresponde a los 45 DDT, podemos observar que, la concentración de los macroelementos aumentó a este tiempo de evaluación, el contenido de N presentó diferencias estadísticamente significativas, siendo mayor en todos los tratamientos, excepto en las plantas tratadas con la matriz sola quedándose con los valores más bajos (Fig. 27).

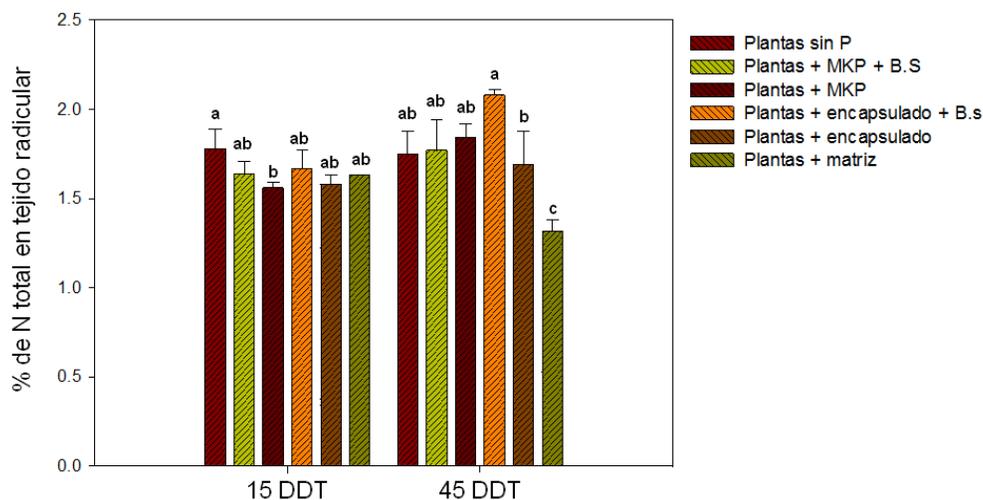


Figura 27. Porcentaje de nitrógeno (N) en el tejido radicular de las plantas de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, *B. subtilis* y almidón de maíz sin tratar. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).

VI. 5. 5. Fósforo en el tejido radicular.

Los resultados que se muestran en la Figura 28, podemos apreciar el contenido del P en el tejido radicular, encontrando diferencias estadísticamente significativas. Los valores bajos se presentan en las plantas sin P y valores altos en las plantas tratadas con el P libre y posteriormente el encapsulado + *B. subtilis*. A los 45 DDT el contenido de P fue mayor en las plantas tratadas con el P libre, seguido de las plantas tratadas con P libre + *B. subtilis*, posteriormente las plantas tratadas con el encapsulado + *B. subtilis*, plantas con encapsulado y con valores más bajos para las plantas sin P. Con los resultados mostrados, seguimos observando que en las plantas tratadas con el encapsulado son las que presentaron menor concentración del P en comparación con las plantas tratadas con el P libre, esto podría deberse a que las raíces están en contacto directo con el fertilizante libre que el encapsulado, por lo que, la asimilación es más rápida. Por otro lado, seguimos citando las ventajas del nanoencapsulado, entre ellas es que, tienen mayor contacto superficial con las raíces de las plantas, son más eficientes e intervienen de manera positiva en el crecimiento de las plantas.

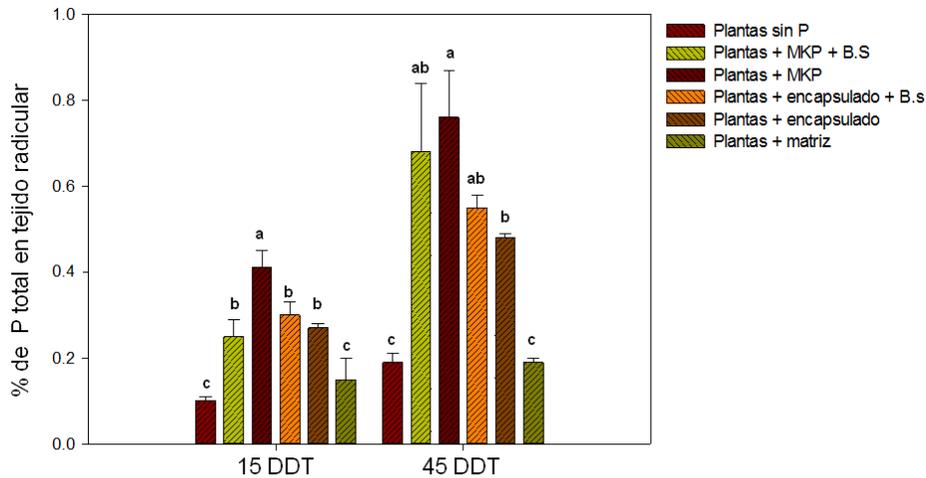


Figura 28. Porcentaje de fósforo (P) en el tejido radicular de las plantas de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, *B. subtilis* y almidón de maíz sin tratar. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).

VI. 5. 6. Potasio en el tejido radicular.

Los resultados del porcentaje total del elemento potasio se muestran en la figura 29, en ella observamos que no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración del potasio en el tejido radicular, en ninguno de los dos muestreos. De manera general, el K no se vio afectado en presencia o ausencia del fósforo, caso contrario al nitrógeno. Esto puede deberse a que, el P interviene en la asimilación del nitrógeno.

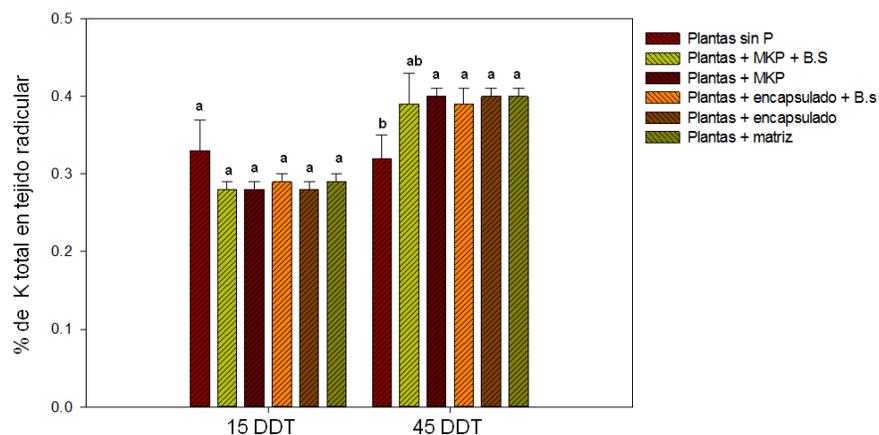


Figura 29. Porcentaje de potasio (K) en el tejido radicular de las plantas de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, *B. subtilis* y almidón de maíz sin tratar. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).

VI. 6. Parámetros fisiológicos que corresponden fotosíntesis, conductancia estomática y transpiración.

En la Figura 30, se muestran las gráficas que corresponden a los parámetros fisiológicos de las plantas, donde podemos observar que, en la fotosíntesis no se aprecian diferencias en el M1. Mientras que, en el M2 las plantas sin P son las que presentan menor actividad fotosintética, esta tendencia se repite en el M3, puesto que, todos los tratamientos que tienen P tienen un comportamiento similar. Las deficiencias del P y baja tasa fotosintética se manifiestan después del M1 en plantas sin P. La fotosíntesis influye de manera directa en la conductancia estomática y transpiración, en la gráfica B, así como en la C, se determina que en los dos primeros muestreos no hubo ninguna diferencia significativa, sin embargo, en el M3 las plantas sin P y tratadas con la pura matriz de almidón son las que presentaron menor conductancia estomática, así mismo en la transpiración. La fotosíntesis es un proceso de las plantas que determina la existencia de la vida en la tierra y a su vez, se sabe que el P juega un papel importante en la transferencia de energía y transferencia de macronutrientes, es por ello que, es importante en el proceso de la fotosíntesis, es indispensable para la diferenciación de las células y para el desarrollo de los tejidos, que son los puntos de crecimiento de todas las plantas silvestres o domesticadas (Márquez, 2017). Mejía de Tafur *et al.* (1992), al aplicar diferentes niveles de P (0, 50, 100 kg/ha) en el cultivo de la yuca, reportan que la tasa fotosintética fue alta, sin presentarse diferencias significativas entre tratamientos, pero si en variedades, dichos datos son similares a los de este estudio, ya que, las plantas que tenían P libre o encapsulado no mostró diferencia en la fotosíntesis, pero si con las plantas sin P. Por otro lado, Martínez (2018), al trabajar con un microencapsulado de fósforo comparando con fósforo libre (MKP) reporta que no encontró diferencias en la fotosíntesis, transpiración ni conductancia estomática bajo estos dos tratamientos, datos similares a los de este trabajo de investigación.

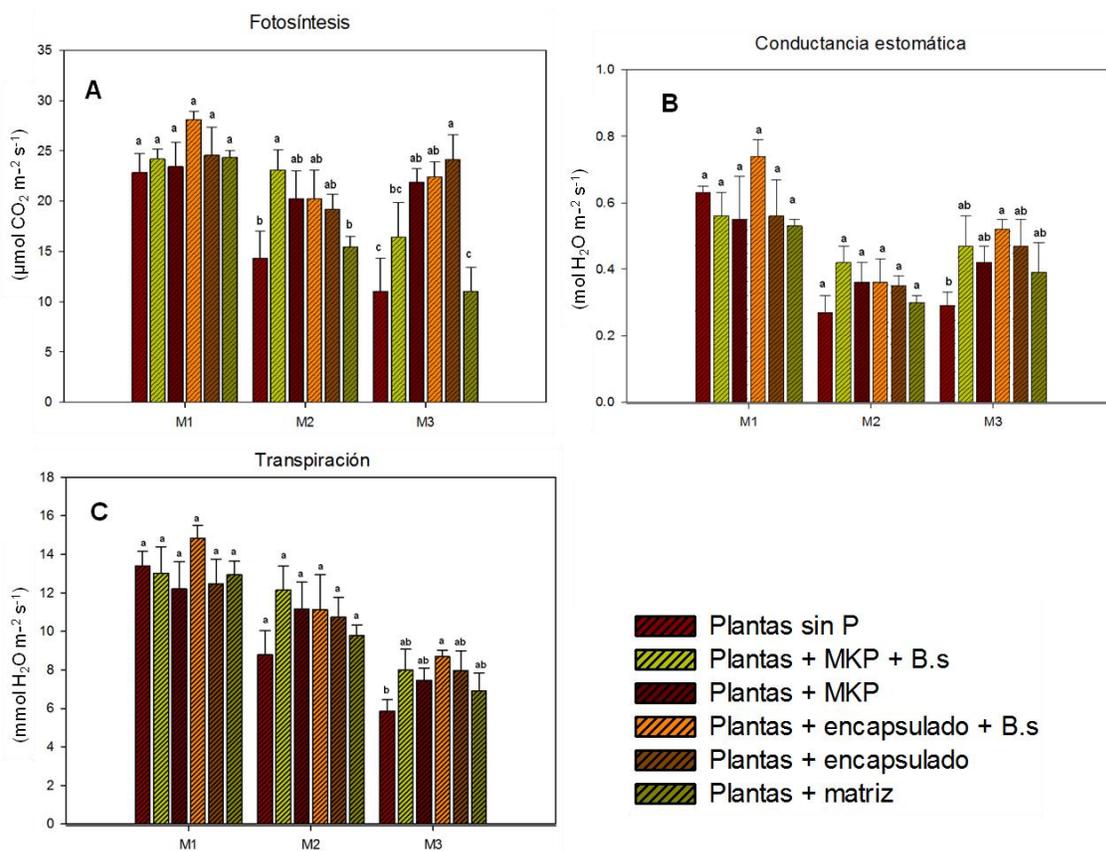


Figura 30. Medición de parámetros fisiológicos: A) Fotosíntesis. C) Conductancia estomática y C) Transpiración en plantas de tomate tratado con nanofertilizante de P encapsulado, MKP comercial, *B. subtilis* y almidón de maíz sin tratar. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT y M3) 45 DDT. Medias \pm E.E con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$).

VI. 7. Evaluación de la colonización de la bacteria *Bacillus subtilis* en raíces de plantas de tomate.

Como se mencionó en la metodología, se realizó el conteo de la colonización de las bacterias en plantas inoculadas y no inoculadas con la bacteria *B. subtilis* antes del trasplante. En la Tabla 4, podemos observar que las plantas tratadas con *B. subtilis* presentaron mayor cantidad de UFC/g de raíz que en las plantas no inoculadas, cabe mencionar que este conteo se realizó antes de aplicar el MKP libre y el encapsulado. Dicho conteo fue general, es decir, que en esta etapa se contaron todas las colonias sin considerar que tipo de bacteria sea. Con los resultados obtenidos en la Tabla 4, podemos determinar que, aunque las plantas no fueron inoculadas tuvieron crecimiento

de bacterias, esto debido a que, en el sustrato no se logró eliminar por completo los microorganismos por la técnica de esterilización del sustrato.

Tabla 4. UFC/g encontradas en las raíces de las plantas de tomate antes de aplicar los tratamientos de MKP libre y encapsulado.

Tratamiento	UFC/g de raíz
Plantas inoculadas con <i>B. subtilis</i>	4.2×10^4
Plantas no inoculadas	3.5×10^4

UFC/g= unidades formadoras de colonia sobre gramo de raíz.

Después de aplicar los tratamientos de P de manera libre o encapsulada en las plantas, se realizó el conteo de UFC/g en las raíces, dicho conteo se hizo en cada muestreo sin importar que especie de bacterias sean, es decir, es un conteo general. En la Tabla 5, podemos observar que, para el M1 la mayor cantidad de colonias encontradas es en las plantas tratadas con el encapsulado mostrando diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos. Sin embargo, para el M2 la mayor cantidad de colonias encontradas fue en las plantas tratadas con MKP libre sin inoculación, dejando muy abajo a las plantas con el encapsulado. Mientras que, para el M3 nuevamente las plantas tratadas con el encapsulado presentaron mayor cantidad de colonias dejando en último lugar a las plantas tratadas con el MKP libre. Con los resultados obtenidos se determina que, aunque el sustrato fue esterilizado no se logró eliminar el 100% de microorganismos, ya que, hubo presencia de bacterias en todos los tratamientos. Las diferencias de UFC/g de raíz que se muestran en la Tabla 5, posiblemente es influenciado por cuestiones técnicas durante la manipulación del lavado y la selección de la raíz. Por otro lado, es necesario considerar que al trabajar con microorganismos vivos bajo condiciones no controlados interviene en el crecimiento de estas mismas, ya que, están influenciadas por la humedad y disponibilidad de alimentos. Por otro lado, se ha determinado si diferentes cantidades y formas de fertilizante de P afectan la diversidad de hongos micorrizicos y la composición de la comunidad asociada con las raíces de las plantas de manzana, donde encontraron que, aquellas plantas tratadas con fertilizantes de liberación lenta, mostraron mayor riqueza de hongos micorrizicos mediante el control de los niveles de P

disponible para las plantas (Van Geel *et al*, 2016). Datos que coinciden con este trabajo de investigación en las plantas tratadas con el encapsulado para el M1 y M3.

Tabla 5. UFC/g encontradas en las raíces de las plantas de tomate tratadas con MKP libre y el encapsulado en los tres muestreos.

Tratamientos	UFC/g (M1)	UFC/g (M2)	UFC/g (M3)
MKP+B.s	1X10 ⁶ b	5X10 ⁷ b	1X10 ⁹ b
MKP libre	1X10 ⁶ b	2X10 ⁸ a	3X10 ⁸ c
Encapsulado + B.s	1.2X10 ⁶ a	2.2X10 ⁷ c	2.5X10 ⁹ a

UFC/g= uniformadoras de colonia sobre gramo de raíz. M1) 15 DDT. M2) 30 DDT. M3) 45 DDT. Medias con una letra común no difieren estadísticamente de acuerdo a LSD ($p \leq 0.05$)

Para poder detectar a la bacteria *Bacillus subtilis* en las plantas inoculadas y no inoculadas, se aislaron colonias puras. Mediante la morfología de colonias y posteriormente la tinción Gram, se logró determinar si en los tratamientos había colonizado la bacteria de interés para este trabajo de investigación. Para ello, tuvimos la cepa original como punto de comparación de morfología. En las siguientes figuras podemos encontrar diferentes cepas de bacterias con diferente morfología, pero con una similitud en la tinción Gram.

Con lo anterior, presentamos en la figura 31, a las bacterias que se encontraron en las raíces de las plantas de tomate tratadas con MKP libre+ *B. subtilis*, como se puede apreciar en la imagen A, las colonias son de color blanco lechoso, muy pequeñas y con bordes uniformes, nada parecido a las colonias típicas del *B. subtilis*. Mientras que, en la tinción Gram, se puede apreciar la presencia de dos tipos de bacterias las Gram negativas y Gram positivas. La de color morado y en forma de bacilos son parecidos a las de la bacteria de interés, es una bacteria del genero *Bacillus*, pero no afirmamos que sea el *B. subtilis* al no presentar la morfología típica en las colonias (A). Sin embargo, puede ser que en la misma colonia (A), se hayan presentado dos tipos de bacterias diferentes dificultando la identificación de la bacteria de interés, por lo que, no se sabe con certeza si sea *B. subtilis* (ver Fig. 31 lado B).

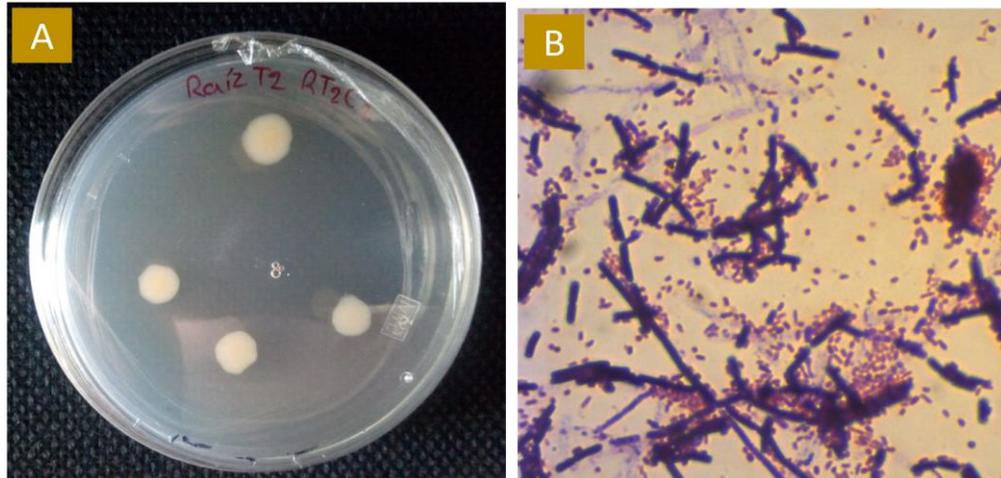


Figura 31. Bacterias que corresponden a las plantas tratadas con MKP libre+ *B. subtilis*. A) Colonias puras y B) Tinción Gram.

En la Figura 32, se observan los resultados obtenidos de las plantas tratadas con MKP libre sin inoculación. En la imagen A, podemos observar que las colonias no se parecen nada a las de la bacteria de interés, así mismo, en la tinción Gram (B). Con estas dos técnicas no podemos definir la especie, pero podemos determinar que a pesar de que, las plantas no fueran inoculadas, estas tienen la capacidad de interactuar con cualquier otro tipo de bacterias.

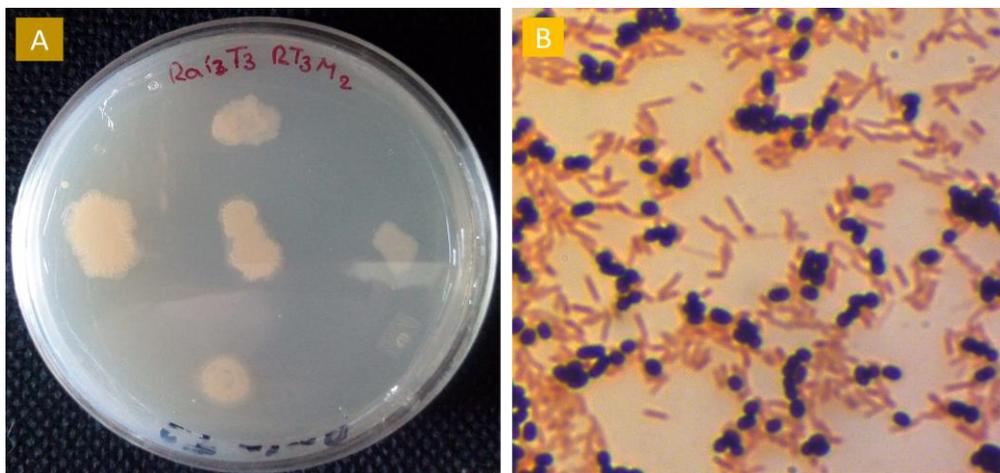


Figura 32. Bacterias que corresponden a las plantas tratadas con MKP libre sin inoculación. A) Colonias puras y B) Tinción Gram.

Para las plantas tratadas con el encapsulado + *B. subtilis*, podemos observar que la morfología de las colonias (A) concuerdan con la bacteria *B. subtilis*, para afirmar si estamos evaluando la bacteria de estudio, se realizó la tinción Gram y se pudo determinar que son similares a las formas en que se reportan, tipo bacilos y Gram positivos. Con lo anterior, se determina que la identificación de la bacteria de interés fue más clara en este tratamiento que en las plantas tratadas con MKP libre + *B. subtilis* (Fig. 33), esto debido a que, la morfología de las colonias encontradas en las plantas tratadas con MKP libre no coinciden con las características de la cepa original.

Las evaluaciones de colonización e identificación, se realizaron en los tres muestreos, pero se encontraron las mismas bacterias en cada muestreo, es por eso que, los resultados se reportan a las que corresponden del primer muestreo.

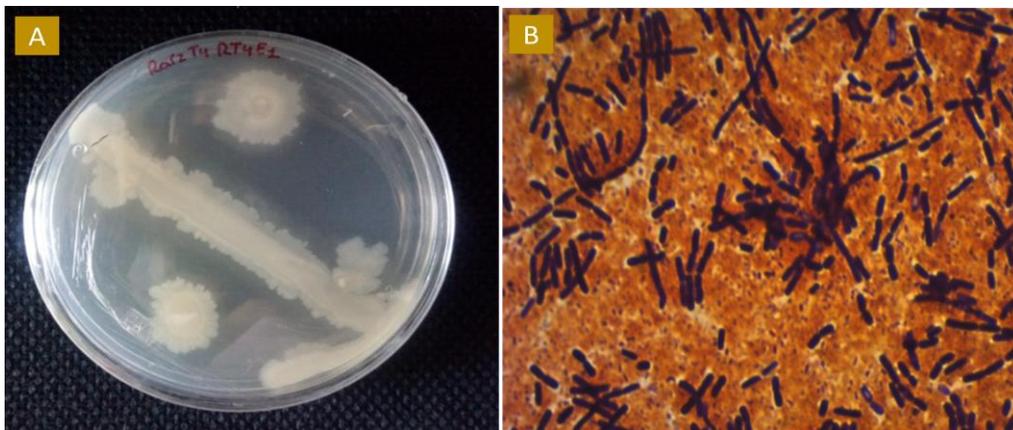


Figura 33. Bacterias que corresponden a las plantas tratadas con el encapsulado + *B. subtilis*. A) Colonias puras y B) Tinción Gram.

VII. CONCLUSIONES

Para los dos bioensayos realizados en plantas de tomate inoculadas con *B. subtilis* y tratadas con el fertilizante de P encapsulado con almidón resultaron satisfactorios, esto debido a que el fertilizante encapsulado no interfiere en la interacción de la rizobacteria-planta, los parámetros biométricos evaluados y la determinación de la presencia de *B. subtilis* en los bioensayos confirman estos resultados.

Las plantas tratadas con MKP libre y *B. subtilis* no mostraron algún efecto negativo en los parámetros biométricos.

La cuantificación del fósforo en el tejido foliar y radicular fue menor en las plantas tratadas con el encapsulado, mientras que, en las plantas tratadas con el fósforo libre, el porcentaje fue mayor. Por lo que, podemos citar el encapsulado como una técnica que optimiza el mineral.

La ausencia del fósforo afectó la concentración del nitrógeno en el tejido foliar y radicular, sin embargo, para el caso del potasio no fue así.

VIII. PERSPECTIVAS

A pesar de que se lograron con los objetivos planteados en este trabajo de investigación, así como, responder a la hipótesis planteada, se sugiere lo siguiente:

- Realizar la cuantificación molecular por qPCR de bacterias en las raíces de las plantas de tomate.
- Evaluar diferentes vías de aplicación del fertilizante encapsulado.
- Diseñar bioensayos con más dosis del fertilizante de P encapsulado para poder evaluar rendimientos de cultivos a nivel invernadero.
- Evaluar la compatibilidad del fertilizante de P encapsulado con otros géneros de rizobacterias benéficas.

IX. LITERATURA CITADA

- A Melaj, M. y E Daraio, M. (2012). Matrices poliméricas sólidas basadas en quitosano y xantano para liberación controlada de fertilizantes. *Avances en Ciencias e Ingeniería*. 3(1): 1-9
- Acuña, O. (2003). El uso de biofertilizantes en la agricultura. Taller de abonos orgánicos. Centro de investigaciones agronómicas de la universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica. 67-75
- Aguilar-Acuña, J. L., Martínez-Hernández, J., Volke-Haller, V., Etchevers-Barra, J., Mata-Vázquez, H. y Hernández-Martínez, M. (2006). Distribución del fósforo en suelo, raíces y materia seca de tubérculos de papa cultivada con fertirriego. *Terra Latinoamericana*. 24(2): 269-276
- Albuquerque, B. O. y Velásquez, G. (2008). Cinética de liberación del fósforo en roca fosfórica. *Revista Cubana de Química*. 20(3): 13-16
- Altieri, M y Nicholl, C.I. (2000). Teoría y práctica para una agricultura sustentable. Capítulo I: Bases agroecológicas para una agricultura sustentable. Editorial PNUMA. D.F. México. 13-45
- Angulo, V. C., Sanfuentes, E. A., Rodríguez, F., y Sossa, K. E. (2014). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista argentina de microbiología*. 46(4), 338-347.
- Anzuay, M. S., Ciancio, M. G. R., Ludueña, L. M., Angelini, J. G., Barros, G., Pastor, N. y Taurian, T. (2017). Growth promotion of peanut (*Arachis hypogaea L.*) and maize (*Zea mays L.*) plants by single and mixed cultures of efficient phosphate solubilizing bacteria that are tolerant to abiotic stress and pesticides. *Microbiological Research*. 199: 98-109
- Arriaga, R., González, H. A., Castillo, G. A. M., Olalde, P. V., Reyes, R. B. G y Aguilera., G. L. I. (2009). Respuesta de *Lilium sp.* al fósforo y su relación con *Glomus fasciculatum* y *Bacillus subtilis*. *Phyton (Buenos Aires)*. 78(2), 91-100.

- Astorga-Quirós, K., Meneses-Montero, K., Zúñiga-Vega, C., Brenes-Madriz, J. A., y Rivera-Méndez, W. (2014). Evaluación del antagonismo de *Trichoderma sp.* y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. *Revista Tecnología en Marcha*. 27(2), 82-91.
- Bawa, R., Bawa, S. R., Maebius, S. B., Flynn, T. y Wei, C. (2005). Protecting new ideas and inventions in nanomedicine with patents. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 1(2): 150-158
- Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 84(1): 11-18
- Bojórquez, A. D. A., Gutiérrez, C. G., Báez, J. R. C., Sánchez, M. Á. A., Montoya, L. G. y Pérez, E. N. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai*. 6(1): 51-56
- Boschetti, N., Quintero, C., Benavidez, R. y Giuffre, L. (2003). Cuantificación de las fracciones orgánicas e inorgánicas de fósforo en suelos de la Mesopotamia Argentina. *Ciencia del suelo*. 21(1): 1-8
- Bustos, F., González, M. E., Donoso, P., Gerding, V., Donoso, C., y Escobar, B. (2008). Efectos de distintas dosis de fertilizante de liberación controlada (Osmocote®) en el desarrollo de plantas de coigüe, raulí y ulmo. *Bosque (Valdivia)*. 29(2): 155-161.
- Cadena, S. F., Castillo, J. A., Samann, K. M. M. y Molina, R. M. (1998). Estimación de la biomasa microbiana en suelos de ladera bajo diferentes sistemas de manejo. *Acta Agronómica*. 48(3-4): 37-42
- Camargo, J. y Alonso, A. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Revista Ecosistemas*. 16(2): 98-110
- Camelo, M., Vera, S. P. y Bonilla, R. R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 12(2): 159-166

- Campaña, L. E. y Naranjo, C. (1988). Estudio de las aguas del lago san pablo y su deterioro por la falta de educación agrícola. De la Pontificia Universidad Católica. 45 pp.
- Cappellari, L. d. R., Chiappero, J., Santoro, M. V., Giordano, W. y Banchio, E. (2017). Inducing phenolic production and volatile organic compounds emission by inoculating *Menthapiperita* with plant growth-promoting rhizobacteria. *Scientia Horticulturae*. 220: 193-198
- Cereza Myo, L. C., M. Murakami y S. Hashimoto. (2017). Las implicaciones de los escenarios de asignación para el fósforo el flujo global de la agricultura y las aguas residuales. *Recursos, Conservación y Reciclaje*. 122: 94-105
- Chávez, B. C., Olalde, P.V., Sánchez, A. A., Padrón, C.E y Flores, O.A. (2006). Uso de rizobacterias para el control de hongos fitopatógenos y promoción de crecimiento en plantas. *Revista Agraria -Nueva Epoca-* Año III. 3(1, 2, 3): 24-31
- Chen, S., Yang, M., Ba, C., Yu, S., Jiang, Y., Zou, H. y Zhang, Y. (2018). Preparation and characterization of slow-release fertilizer encapsulated by biochar-based waterborne copolymers. *Science of The Total Environment*. 615: 431-437
- Cofie, O., Van Veenhuizen, R., De Vreede, V. y Maessen, S. (2010). Gestión de Residuos para la Recuperación de Nutrientes: Opciones y Desafíos para la Agricultura Urbana. *Revista Agricultura Urbana*. 5 (23): 3-7
- Cole, J.C., Smith, M.W., Penn, C.J., Cheary, B.S y Conaghan, K.J. (2016). El nitrógeno, el fósforo, el calcio y el magnesio aplicados individualmente o como un fertilizante de liberación lenta o de liberación controlada aumentan el crecimiento y el rendimiento y afectan la concentración de macronutrientes y micronutrientes y el contenido de las plantas de tomate cultivadas en el campo. *Scientia horticulturae*. 211: 420-430.
- Daroub, S. H., Gerakis, A., Ritchie, J. T., Friesen, D. K. y Ryan, J. (2003). Development of a soil-plant phosphorus simulation model for calcareous and weathered tropical soils. *Agricultural Systems*. 76(3): 1157-1181
- de la Fuente, E. B. y Suárez, S. A. (2008). Problemas ambientales asociados a la actividad humana: la agricultura. *Ecología Austral*. 18(3): 239-252.

- de Oliveira, J. L., Campos, E. V. R., Bakshi, M., Abhilash, P. C. y Fraceto, L. F. (2014). Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. *Biotechnology Advances*. 32(8): 1550-1561
- Devau, N., Cadre, E. L., Hinsinger, P., Jaillard, B. y Gérard, F. (2009). Soil pH controls the environmental availability of phosphorus: Experimental and mechanistic modelling approaches. *Applied Geochemistry*. 24(11): 2163-2174
- Duhan, J. S., Kumar, R., Kumar, N., Kaur, P., Nehra, K. y Duhan, S. (2017). Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. *Biotechnology Reports*. 15: 11-23
- Eisenhauer, N. (2016). Plant diversity effects on soil microorganisms: Spatial and temporal heterogeneity of plant inputs increase soil biodiversity. *Pedobiologia*. 59(4): 175-177
- FAO e IFA. 2002. Los Fertilizantes y su Uso. 4° edición. Roma. 87 p.
- Fernández, M. T. (2007). Fósforo: amigo o enemigo. ICIDCA. Sobre los derivados de la Caña de Azúcar. 41(2): 14-21
- Flores, J.M., D. L. Á., Mendoza V. R. D. A., Sandoval R. A. D., y Valdés A. L. U. I. S. (2018). Efectos biológicos de superbac m-90 en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). Tesis Licenciatura. Departamento de Horticultura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 59 pp.
- Flores-Gorosquera, E., García-Suárez, F. J., Flores-Huicochea, E., Núñez-Santiago, M. C., González-Soto, R. A. y Bello-Pérez, L. A. (2004). Rendimiento del proceso de extracción de almidón a partir de frutos de plátano (*Musa paradisiaca*). Estudio en planta piloto. *Acta Científica Venezolana*. 55(1): 86-90
- Foladori, G. (2006). Nanotechnology in LatinAmerica at the crossroads. *Nanotech. L. y Bus*. 3: 205 p
- Foladori, G. y Invernizzi, N. (2005). Nanotecnología: ¿beneficios para todos o mayor desigualdad? *Redes*, Universidad Nacional de Quilmes Bernal Este, Argentina. 11(21): 55-75

- Fraceto, L. F., Grillo, R., de Medeiros, G. A., Scognamiglio, V., Rea, G. y Bartolucci, C. (2016). Nanotechnology in Agriculture: Which Innovation Potential Does It Have? *Frontiers in Environmental Science*. 4. 20 p
- Fujikawa, H. y Matsushita, M. (1989). Fractal growth of *Bacillus subtilis* on agar plates. *Journal of the physical society of japan*. 58(11): 3875-3878
- Gao, S., Wu, H., Yu, X., Qian, L. y Gao, X. (2016). Swarming motility plays the major role in migration during tomato root colonization by *Bacillus subtilis* SWR01. *Biological Control*. 98: 11-17
- Giri, B., Giang, P. H., Kumari, R., Prasad, R. y Varma, A. (2005). Microbial diversity in soils. En *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. 19-55 pp
- González, H.M. (2011). Fertilizantes de liberación lenta y su aplicación en campo. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 111-123.
- González, M., García, M. R., Hernández, M. I., Rodríguez, C., Rieumont, J., Cuesta, E., Sardinias, C. y Morales, A. (2005). Obtención de un fertilizante de liberación lenta y controlada enriquecido con diferentes plantas marinas. *Revista Cubana de Química*. 17(3): 25-31
- Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H.-S. y Patra, J. K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*. 206: 131-140
- Huertas, R. A. P. (2010). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 63(2): 5669-5684
- Hurtado, M. G., Díaz, M. I. H., Martell, D. D., Briones, J. R., Acosta, C. R., Cuesta, E. y Sardiña, C. (2007). Síntesis y comportamiento de un material polimérico aplicado como recubrimiento en un fertilizante de liberación controlada. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 8(4): 275-286
- Iavicoli, I., Leso, V., Beezhold, D. H. y Shvedova, A. A. (2017). Nanotechnology in agriculture: Opportunities, toxicological implications, and occupational risks. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 329: 96-111

- Jarosiewicz, A y Tomaszewska, M. (2003). Controlled-Release NPK Fertilizer Encapsulated by Polymeric Membranes. *Agricultural and Food Chemistry*. 51: 413–417
- Javed, R., Usman, M., Yücesan, B., Zia, M. y Gürel, E. (2017). Effect of zinc oxide ZnO nanoparticles on physiology and steviol glycosides production in micropropagated shoots of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Physiology and Biochemistry*. 110: 94-99
- Juanico, A., Camacho, C., Villegas, D., Minutti, B., Morales, G. y Gutierrez, E. (2016). Nanociencia y nanotecnología en México: orígenes, evolución y progreso. *Momento-Revista de Física*. (51E): 46-53
- Kashyap, P. L., Xiang, X. y Heiden, P. (2015). Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *International Journal of Biological Macromolecules*. 77: 36-51
- Khot, L. R., Sankaran, S., Maja, J. M., Ehsani, R., & Schuster, E. W. (2012). Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: a review. *Crop protection*.35: 64-70.
- La Iniciativa Nacional De Nanotecnología INN. ¿Que es la nanotecnología? Consultado el 17/05/2017 en <https://www.nano.gov/nanotech-101/what/definition>.
- Lara, C., Esquivel Avila, L. M. y Penata, N. (2011). Native phosphate solubilizing bacteria to increase the crops in the department of Cordova-Colombia. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 9(2): 114-120
- Layton, C. (2011). *Bacillus spp.*; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Nova*. 9(16): 177-187
- Liu, R. y Lal, R. (2015). Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Science of The Total Environment*. 514: 131-139
- Liu, Y., Villalba, G., Ayres, R. U. y Schroder, H. (2008). Global phosphorus flows and environmental impacts from a consumption perspective. *Journal of Industrial Ecology*. 12(2): 229-247
- López, M., López de Rojas, I., España, M., Izquierdo, A. y Herrera, L. (2007). Efecto de la fertilización inorgánica sobre la disponibilidad de nutrimentos en el suelo, nivel

- nutricional de la planta y hongos micorrícicos arburculares en plantaciones de *Theobroma cacao*. *Agronomía Trop.* 57(1): 31-43
- López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., y Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*, 3(1): 10-18.
- Loredo-Osti, C., López-Reyes, L. y Espinosa-Victoria, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*. 22(2): 225-239
- Luna, Martínez, L., Martínez Peniche, R. A., Hernández Iturriaga, M., Arvizu Medrano, S. M. y Pacheco Aguilar, J. R. (2013). Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 36(1): 63-69
- Márquez, C. J. D. (2017). Respuesta de cuatro variedades de “cebolla colorada” (*Allium cepa*), a la fertilización con fósforo. Universidad Técnica de Babahoyo. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Tesis de Licenciatura. 65 pp
- Marschner, P., Crowley, D. y Rengel, Z. (2011). Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis – model and research methods. *Soil Biology and Biochemistry*. 43(5): 883-894
- Martínez, A. L., Damas, L. I., y Ruiz, A. N. R. (2012). Validación agronómica del biobac® en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en condiciones de agricultura orgánica. *Observatorio de la Economía Latinoamericana*. (161). 9 pp
- Martínez, R. L. A. (2018). Comportamiento de un fertilizante fosfórico encapsulado con cera de candelilla en condiciones *in vitro*, e *in vivo* con tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.). Tesis maestría en CIQA. 134 pp.
- Mejía de Tafur, M. S., Cadavid, L. L. F., y El-Sharkawy, M. A. (1992). Respuesta de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) a la aplicación de fósforo en un ultisol de Santander de Quilichao. *Suelos Ecuatoriales (Colombia)*. 1: 95-97

- Mena-Violante, H. G., y 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.
- Messa, L. L., Froes, J. D., Souza, C. F., y Faez, R. (2016). Chitosan-clay hybrid for encapsulation of fertilizers and release sustained of potassium nitrate fertilizer. *Química Nova*. 39(10): 1215-1220.
- Meza, A. (2006). Desarrollo de películas o recubrimientos comestibles con potencial para el recubrimiento de frutas frescas. Proyecto de especialización en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. 76 p.
- Mousavi, S. R. y Rezaei, M. (2011). Nanotechnology in agriculture and food production. *Applied Environmental and Biological Sciences*. 1(10): 414-419
- Mulder, W. J., Gosselink, R. J. A., Vingerhoeds, M. H., Harmsen, P. F. H. y Eastham, D. (2011). Lignin based controlled release coatings. *Industrial Crops and Products*. 34(1): 915-920
- Naderi, M. y Danesh-Shahraki, A. (2013). Nanofertilizers and their roles in sustainable agriculture. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 5(19): 2229-2232
- Nakamatsu, J. (2017). Matrices Poliméricas para Liberación Controlada de Sustancias Activas. *Revista de Química*. 16(1-2): 13-23
- Nakasato, D. Y., Pereira, A. E. S., Oliveira, J. L., Oliveira, H. C. y Fraceto, L. F. (2017). Evaluation of the effects of polymeric chitosan/tripolyphosphate and solid lipid nanoparticles on germination of *Zea mays*, *Brassica rapa* and *Pisum sativum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 142: 369-374
- Nakkeeran, S., Fernando, W. D., Siddiqui, Z. y Siddiqui, Z. (2005). PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer Dordrecht. 257-296 pp
- ONU. (2013). Centro de las Naciones Unidas. Consultado el 12/05/2017 en <http://www.un.org/spanish/News/story.asp?newsID=26703#.WRYMgVWGN0w>

- Ortiz, G.M.A. (2013). Posición de las Principales Hortalizas en México: 2000-2011 consultado el 17/05/2017 en <http://ciep.mx/posicion-de-las-principales-hortalizas-en-mexico-2000-2011/>.
- Paredes-Mendoza, M. y Espinosa-Victoria, D. (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*. 28(1): 61-70
- Pedraza, R. O., Teixeira, K. R., Scavino, A. F., de Salamone, I. G., Baca, B. E., Azcón, R., Baldani, V. L. y Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 11(2): 155-164
- Peña-Cabriales, J., Grajeda-Cabrera, O. y Vera-Nuñez, J. (2001). Manejo de los fertilizantes nitrogenados en México: Uso de las técnicas isotópicas (¹⁵N). *Terra*. 20(1): 51-56
- Peña-Venegas, C. P., Cardona, G. I., Arguelles, J. H. y Arcos, A. L. (2007). Micorrizas arbusculares del sur de la amazonia colombiana y su relación con algunos factores fisicoquímicos y biológicos del suelo. *Acta Amazónica*. 37(3): 327-336
- Pérez-García, A., Romero, D. y de Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*. 22(2): 187-193
- Picone, L. y Zamuner, E. (2002). Fósforo orgánico y fertilidad fosfórica. *Informaciones agronómicas del cono sur*. 16: 11-15
- Poddar, K., Vijayan, J., Ray, S. y Adak, T. (2018). Chapter 10 - Nanotechnology for Sustainable Agriculture. En *Biotechnology for Sustainable Agriculture*. (Eds.). ed. Vol. Woodhead Publishing. 281-303 pp
- Posada, L. F., Alvarez, J. C., Hu, C.-H., de-Bashan, L. E. y Bashan, Y. (2016). Construction of probe of the plant growth-promoting bacteria *Bacillus subtilis* useful for fluorescence in situ hybridization. *Journal of Microbiological Methods*. 128: 125-129

- Pose, N. N., Zamuner, E. C. y Echeverría, H. E. (2012). Grado de saturación y riesgo de pérdidas de fósforo en un molisol del Sudeste bonaerense cultivado con papa. *Ciencia del suelo*. 30(1): 01-08
- Powell, J. R., Craven, D. y Eisenhauer, N. (2014). Recent trends and future strategies in soil ecological research—Integrative approaches at Pedobiologia. *Pedobiologia*. 57(1): 1-3
- Qiao, D., Liu, H., Yu, L., Bao, X., Simon, G. P., Petinakis, E., y Chen, L. (2016). Preparation and characterization of slow-release fertilizer encapsulated by starch-based superabsorbent polymer. *Carbohydrate polymers*. 147: 146-154.
- Quispe Challco, C. R. (2010). Nanotecnología en la Agricultura. *Revista de información, tecnología y sociedad*. 72 p
- Rameshaiah, G. y Jpallavi, S. (2015). Nano fertilizers and nano sensors—an attempt for developing smart agriculture. *International Journal of Engineering Research and General Science*. 3(1): 2091-2730
- Ramos Hernández, M., Flores Olivas, A. D. A., Olade Portugal, V. D., Cerna Chavez, E. D., Gallegos Morales, G. G. y González Morales, S. (2011). *Bacillus subtilis*: producción de fracciones peptídicas antimicrobianas y promoción de crecimiento vegetal de tomate. 62 p
- Ramos-García, M. d. L., Bautista-Baños, S., Barrera-Necha, L. L., Bosquez-Molina, E., Alia-Tejagal, I. y Estrada-Carrillo, M. (2010). Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28(1): 44-57
- Raven, H.P., F.R. Evert, y E. S. Eichhorn. (1992). *Biología de las plantas*. Editorial Reverté. España. 671 p
- Recasens, L. (2008). Los fertilizantes de liberación controlada. *Boletín de Horticultura*. Diario EXTRA. Guayaquil, EC, 74-83 p
- Restrepo-Franco, G. M., Marulanda-Moreno, S., de la Fe-Pérez, Y., Díaz-de la Osa, A., Lucia-Baldani, V. y Hernández-Rodríguez, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y

- sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CenicCiencias Biológicas*. 46(1): 63-76
- Reyes, I., Alvarez, L., El-Ayoubi, H., & Valery, A. (2008). Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro*, 20(1), 37-48
- Richardson, A. E. (2001). Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Functional Plant Biology*. 28(9): 897-906
- Richardson, A. E. y Simpson, R. J. (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant physiology*. 156(3): 989-996
- Rincón, L. E. C., y Gutiérrez, F. A. A. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista colombiana de biotecnología* 14(1): 285-295.
- Rodríguez, H. y Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. 17(4): 319-339
- Rodríguez, O. J. C. (1998). Efecto del nitrógeno, fósforo y potasio en el crecimiento y producción de plántulas de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) var. Floradade. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. 105 p
- Sabir, S., Arshad, M. y Chaudhari, S. K. (2014). Zinc oxide nanoparticles for revolutionizing agriculture: synthesis and applications. *The Scientific World Journal*. 2014: 1-8
- SAGARPA y FAO. (2012). México: el sector agropecuario ante el desafío del cambio climático. Vol. 1. 439 p
- SAGARPA. (2016). Comunicado de prensa: exportaciones de tomate aumentan 22.7 por ciento en cinco meses. Baja California Sur, México. 2 p
- Sahoo, S. C. (2014). Use of nanotechnology in agriculture. *Science Horizon*. 19 p
- Salem, N. M., Albanna, L. S. y Awwad, A. M. (2016). Green synthesis of sulfur nanoparticles using *Punica granatum* peels and the effects on the growth of tomato by foliar spray applications. *Environmental Nanotechnology, Monitoring y Management*. 6: 83-87

- Samayoa, A.E y Flores, L.L.F. (1992). Memorias II Simposio y I Reunión Nacional. Agricultura Sustentable: un enfoque ecológico, socioeconómico y de desarrollo tecnológico “Perspectivas de la agricultura en México”. Editorial Colegio de Posgraduados, México.
- Sánchez-López, D. B., Gómez-Vargas, R. M., Garrido Rubiano, M. F. y Bonilla Buitrago, R. R. (2012). Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 3(7): 1401-1415
- Sheng, X., He, L., Wang, Q., Ye, H., y Jiang, C. (2008). Effects of inoculation of biosurfactant-producing *Bacillus* sp. J119 on plant growth and cadmium uptake in a cadmium-amended soil. *Journal of Hazardous Materials*. 155(1-2): 17-22.
- Silva Rossi, M. M., Rollán, A. A. y Bachmeier, O. A. (2006). Biodisponibilidad de fósforo en un suelo del sur de Santa Fe (Argentina): Efectos de dos fuentes fosfatadas y sus mezclas con urea. *Agriscientia*. 23(2): 91-97
- Sivila de Cary, R. y Angulo, W. (2006). Efecto del descanso agrícola sobre la microbiota del suelo (Patarani-Altiplano Central boliviano). *Ecología en Bolivia*. 41(3): 103-115
- Smol, M., Kulczycka, J. y Kowalski, Z. (2016). Sewage sludge ash (SSA) from large and small incineration plants as a potential source of phosphorus – Polish case study. *Journal of Environmental Management*. 184 (3): 617-628
- Solanki, M. K., Singh, R. K., Srivastava, S., Kumar, S., Kashyap, P. L., y Srivastava, A. K. (2015). Characterization of antagonistic-potential of two *Bacillus* strains and their biocontrol activity against *Rhizoctonia solani* in tomato. *Journal of basic Microbiology*. 55(1). 82-90.
- Subramani, K. y Ahmed, W. (2018). Chapter 1 - Nanotechnology and its applications in dentistry—An introduction. En *Emerging Nanotechnologies in Dentistry (Second Edition)*. (Eds.). ed. Vol. William Andrew Publishing.1-15 p
- Teixeira, R. D. S., Ribeiro da Silva, I., Nogueira de Sousa, R., Márcio Mattiello, E., y Barros Soares, E. M. (2016). Organic acid coated-slow-release phosphorus fertilizers improve P availability and maize growth in a tropical soil. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 16 (4): 1097-1112

- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M. M. y Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. 42(3): 131-138
- Terry, A.E., Leyva, A y Hernandez, A. (2005). Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Revista colombiana de Biotecnología*, 7: 47-54.
- Theodorou, M.E y Plaxton W.C. (1993). Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiol*. 101: 339–344
- Tilak, K., Ranganayaki, N., Pal, K., De, R., Saxena, A., Nautiyal, C. S., Mittal, S., Tripathi, A. y Johri, B. (2005). Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*. 89(1): 136-150
- Tomaszewska, M. y Jarosiewicz, A. (2002). Use of polysulfone in controlled-release NPK fertilizer formulations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(16): 4634-4639
- Tomaszewska, M. y Jarosiewicz, A. (2006). Encapsulation of mineral fertilizer by polysulfone using a spraying method. *Desalination*. 198(1): 346-352
- Tyliszczak, B., Polaczek, J., Pielichowski, J., y Pielichowski, K. (2009). Preparation and Properties of Biodegradable Slow-Release PAA Superabsorbent Matrixes for Phosphorus Fertilizers. In *Macromolecular Symposia*. 279 (1): 236-242
- Vallejo, C.F.A y Estrada, S.I.A. (2004). *Producción de hortalizas de clima cálido*. Universidad Nacional de Colombia. 315 pp.
- Van Geel, M., De Beenhouwer, M., Ceulemans, T., Caes, K., Ceustermans, A., Bylemans, D., y Honnay, O. (2016). Application of slow-release phosphorus fertilizers increases arbuscular mycorrhizal fungal diversity in the roots of apple trees. *Plant and Soil*. 402 (1-2): 291-301
- Venkatachalam, P., Priyanka, N., Manikandan, K., Ganeshbabu, I., Indiraarulsevi, P., Geetha, N., Muralikrishna, K., Bhattacharya, R. C. y Tiwari, M. (2017). Enhanced plant growth promoting role of phycomolecules coated zinc oxide nanoparticles with P

supplementation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*. 110: 118-127

Zaidi, S., Usmani, S., Singh, B. R., y Musarrat, J. (2006). Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere*, 64(6), 991-997.

Záyago-Lau, E. y Foladori, G. (2010). La nanotecnología en México: un desarrollo incierto. *Economía, sociedad y territorio*. 10(32): 143-178

Zhang, M., Gao, B., Chen, J., Li, Y., Creamer, A. E. y Chen, H. (2014). Slow-release fertilizer encapsulated by graphene oxide films. *Chemical Engineering Journal*. 255: 107-113

Zohuriaan-Mehr, M. J. y Kabiri, K. (2008). Superabsorbent polymer materials: A review. *Iranian Polymer*. 17(6): 451-477