

Uso de biofertilizantes como una herramienta para mejorar la producción y calidad de un cultivo intensivo de pimientos

Noelia Lupiáñez Fernández

Máster en Horticultura mediterránea bajo invernadero. Julio, 2021.

Directores: Isabel Miralles Mellado y Raúl Ortega Pérez

Resumen: El crecimiento poblacional y la alta demanda de hortalizas ha llevado al notorio crecimiento de los cultivos bajo abrigo en Almería. A su vez, la constante explotación sugiere buscar alternativas al uso extendido de fertilizantes sintéticos para evitar impactos medioambientales y rentabilizar la agricultura. La aplicación de microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (sus siglas en inglés PGPM) parece una buena solución a estos problemas debido a que ayudan a solubilizar y absorber nutrientes fundamentales, permitiendo así la disminución de los fertilizantes químicos a cambio de una mayor producción. Los resultados de este estudio llevados a cabo en cultivo de pimiento sugieren que las PGPM no solo son capaces de ayudar a la absorción de nutrientes, sino que aumentan el crecimiento vegetativo y la producción del cultivo debido a la producción de diferentes hormonas vegetales.

Palabras clave: PGPM, Pimiento, Biofertilizantes

Abstract: Population growth and high demand for vegetables has led to the notorious growth of crops under shelter in Almeria. At the same time, the intensive exploitation suggests looking for alternatives to the widespread use of synthetic fertilisers to avoid environmental impacts and make agriculture profitable. Plant Growth promoting microorganisms (PGPM) can be a good solution to these problems because they help to solubilise and absorb nutrients, thus allowing the decrease of fertilisers chemicals in exchange for increased production. The results of this study with PGPM carried out in pepper culture suggest that PGPM are not only capable of helping the absorption of nutrients, but increasing vegetative growth and crop production, due to the production of different plant hormones.

Keywords: PGPM, Pepper, Biofertiliser

1. INTRODUCCIÓN

El notable crecimiento poblacional hace indispensable que la producción de alimentos deba crecer de forma paralela, teniendo un papel fundamental en las dietas equilibradas el consumo de frutas y verduras, elementos principales en la alimentación por su alto valor nutricional ya que cuentan con gran cantidad de vitaminas, proteínas, minerales y aceites esenciales (Hassan & Abd Alhafez, 2016). En estas circunstancias, los cultivos intensivos bajo abrigo se han hecho indefectibles para lograr proporcionar estos alimentos primarios en la dieta a la mayoría de la población y asegurar su consumo en todas las épocas del año.

Los cultivos protegidos constituyen el sector más dinámico de la agricultura andaluza por su productividad económica, superando la superficie invernada, en la campaña 2020-2021, las 35000 hectáreas y siendo Almería el principal exponente de la producción bajo invernadero, concentrando más del 80% de la superficie andaluza (Observatorio de precios y mercados Junta de Andalucía, 2021). De los principales cultivos en la provincia de Almería, el pimiento tiene una importancia bastante destacable ya que representa el 34% de la superficie cultivada (Observatorio de precios y mercados Junta de Andalucía, 2021).

El pimiento, *Capsicum annuum L.*, pertenece a la familia de las solanáceas. Son plantas herbáceas de porte variable con ciclo de cultivo anual. Su éxito radica en sus diferentes consumos: en fresco, conserva o para pimentón derivando así diferentes tipologías varietales de las cuales, en Almería, se cultiva predominantemente la tipología de pimiento dulce en la que encontramos tipo lamuyo, tipo california o tipo italiano. Además, el cultivo de pimiento requiere poca mano de obra en comparación con otros cultivos y cuenta con lucha integrada de éxito contra las plagas lo que lo hace el cultivo ideal para los agricultores, que también cuentan con el aumento de demanda en el mercado (Infoagro 2021).

El abonado en los cultivos de invernadero suele basarse en fertilizantes sintéticos inorgánicos aplicados mediante fertirriego. Sin embargo, las presiones económicas y medioambientales han sugerido reflexionar acerca del tipo de manejo ya que el uso de fertilizantes sintéticos tiene efectos negativos como es la acumulación de sales que dan lugar a una alta conductividad eléctrica, tóxica para los vegetales (Ortega et al., 2020), y contaminación de aguas debido a la lixiviación de compuestos nitrogenados. Además, la obtención de fertilizantes sintéticos cada vez es más costoso debido al agotamiento de los mismos (Stewart, 2013).

Nos encontramos así con un grave despilfarro de recursos y problemas ambientales derivados del sistema agrícola intensivo, por lo que es importante desarrollar mecanismos más eficientes y con menor impacto ambiental para dirigirnos hacia una agricultura más sostenible.

Los estudios científicos han demostrado que las poblaciones microbianas son componentes clave en el sistema continuo suelo-planta, promoviendo el desarrollo de los cultivos y dejando en evidencia que la fertilidad del suelo no solo depende de su composición química sino también de la naturaleza cuantitativa y cualitativa de los microorganismos que habitan en él (Pedraza et al., 2010). Por esta razón, los microorganismos pueden ser un factor clave para obtener mejores rendimientos de los cultivos, logrando mayores producciones y más sostenibles.

La mayoría de los estudios acerca de los microorganismos con influencia en la fertilidad del suelo los clasifican de acuerdo con tres funciones: degradadores de residuos orgánicos, bacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos y bacterias antagonistas de patógenos de raíces. Algunos de estos microorganismos, los endofíticos, son incluso capaces de colonizar las raíces y desarrollar actividades dentro de la planta para promover el crecimiento y protección vegetal. (Pedraza et al., 2010).

Es conocido como los microorganismos promotores del crecimiento de las plantas o PGPM (Plant Growth-promoting Microorganism) poseen numerosos efectos positivos como la fijación de N_2 (ej. *Azospirillum sp.*), la solubilización de fósforo (P) inorgánico (ej. *Pseudomonas sp.*), mineralización de P orgánico, la capacidad de producir inductores del crecimiento como auxinas, ácidos orgánicos (ácidos oxálico, fumárico y cítrico) y fosfatasa facilitando la solubilidad del P y otros nutrientes (Mesas, 2014, Ortega et al, 2017).

Diversos estudios realizados con biofertilizantes en diferentes cultivos de pimiento dejan ver que la aplicación más eficiente de estas PGPM es a través del fertirriego y que incluso la aplicación de microorganismos con una disminución en dicho riego de fertilizantes químicos, iguala e incluso llega a superar a la producción obtenida en el cultivo de pimiento mediante fertilización química (Hassan & Abd Alhafez, 2016; Stalin Rivera Figueroa, 2016).

En esta línea, el presente trabajo pretende estudiar el efecto fertilizante de varias cepas de PGPM fijadoras de N y solubilizadoras de P y K en un cultivo intensivo de pimiento bajo invernadero en la provincia de Almería. Los objetivos parciales se centrarán en analizar si se incrementa la calidad de los frutos y el rendimiento y producción del cultivo, y en analizar las variaciones en los contenidos NPK en suelos, planta y frutos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Localización y estructura del invernadero

El estudio se ha llevado a cabo en un invernadero localizado en Santa María del Águila (El ejido) en las coordenadas 36.7658439, -2.7075180.

La estructura del invernadero es de tipo “raspa y amagado”, siendo la altura de la cumbre 3.5 m (“raspa”) y la altura del “amagado” 2.5 m. El invernadero es multicapilla de acero galvanizado con paredes y el techo de polietileno (200 µm de espesor). La ventilación se lleva a cabo a través de las bandas (2.5 m de altura) y ventanas cenitales. La orientación es este-oeste con líneas de cultivo alineados norte-sur. El invernadero cuenta con una extensión de 10.000 m².

El cultivo posee suelo enarenado y riego por goteo de caudal de 3L/h, situado en líneas pareadas con 0.8 m de distancia entre líneas de cada par, 1.2 m de separación entre pares de líneas adyacentes y 0.5 m entre goteros dentro de una misma línea, consiguiendo una densidad de 2 plantas por m².

2.2. Material vegetal

Para este ensayo se ha elegido la variedad de pimiento Melchor de la casa de semillas Zeraim Ibérica, propia de plantaciones tardías. Son plantas vigorosas, aireadas, con alta producción y con alta resistencia a tobamovirus. Sus frutos son tipo california, cuadrados con cuatro cascotes predominantemente, que maduran de verde a rojo, pudiendo recolectarse tanto en verde como en rojo.

2.3. Plan de abonado y uso de biofertilizantes

Con respecto a la fertilización convencional se mantuvo un fertirriego a base de productos inorgánicos solubles, ajustado al tipo de cultivo y estadio vegetal e igual en todos los tratamientos (Tabla 1).

PLAN ABONADO PIMIENTO																
AGRICULTOR: NICOLAS RODRIGUEZ GONZALEZ-ISABEL NAVARRO CARA												CAMPANA 2020-2021				
Variedad: Melchor	Plantacion: 04/08/2020				Superficie: 1,1 Ha				Pol: 14	Par: 284	Municipio: El Ejido					
CE del agua de riego 1,2 (ds/m)	Tanque 1 (Kg/1000l)	Tanque 2 (Kg/1000l)	Tanque 3 (Kg/1000l)	Tanque 4 (Kg/1000l)	Tanque 1 (Kg/1000l)	Tanque 2 (Kg/1000l)	Tanque 3 (Kg/1000l)	Tanque 4 (Kg/1000l)	Tanque 1 (Kg/1000l)	Tanque 2 (Kg/1000l)	Tanque 3 (Kg/1000l)	Tanque 4 (Kg/1000l)	Tanque 1 (Kg/1000l)	Tanque 2 (Kg/1000l)	Tanque 3 (Kg/1000l)	Tanque 4 (Kg/1000l)
Nitrato cálcico				150				150				150				150
Nitrato potásico		150				150				150				150		
Sulfato amónico	50				50				50				50			
Fosfato monopotásico			25				25				25				25	
13-40-13			25				25				25				25	
20-20-20	50				50				50				50			
Ácido fosfórico			20				20				20				20	
Calcio quelatado				10				10				10				10
Microelementos				5				5				5				5
PH	6				6				6				6			
CE (ds/m)	1,9				2,5				2,2				2,5			
%	25	25	20	35	10	45	35	20	25	30	25	45	15	45	20	25
Estado fenológico	Crecimiento				Floración				Engorde				Maduración			

Tabla 1. Plan de abonado del cultivo de pimiento del proyecto.

Respecto al uso de biofertilizantes se utilizaron tres productos basados en compuestos bacterianos comercializados por la empresa Nostoc biotech S.L, los cuales se han aplicado también mediante el sistema de riego por goteo, siguiendo las instrucciones propuestas por el comerciante (razón de 1L/ha de cada biofertilizante).

- **BIO N:** contiene microorganismos (cepa de *Rhizobium pusense*) con la capacidad fijar nitrógeno atmosférico.
- **BIO P:** contiene microorganismos (cepa de *Bhurkolderia cepacia*) capaces de solubilizar fósforo bloqueado en el suelo y ponerlo a disposición de las plantas.
- **BIO K:** contiene microorganismos (cepa de *Bhurkolderia cepacia*) capaces solubilizar el potasio presente en el suelo facilitando a la planta su absorción.

2.4. Diseño del experimento

La superficie del invernadero se dividió en tres zonas determinadas por los sectores de riego. En todo el invernadero se aplicó el mismo régimen de fertirriego con fertilizantes sintéticos y respecto a los biofertilizantes se aplicaron según los tratamientos descritos a continuación:

- **Tratamiento 1 o control (AZUL):** No hubo aplicación de biofertilizantes.
- **Tratamiento 2 (BLANCO):** Solo se aplicaron biofertilizantes una única vez (11/08/2020), una semana después del trasplante del cultivo.
- **Tratamiento 3 (AMARILLO):** Se aplicaron biofertilizantes con una periodicidad aproximada de cada 40 días desde una semana después al trasplante del cultivo.

Los muestreos del estudio han sido: un muestreo de medidas morfométricas de plantas durante la fase vegetativa del cultivo, 4 muestreos microbiológicos en suelos, 3 muestreos de suelos para medir contenidos NPK, 2 en hojas y uno en frutos para medir contenidos NPK, y 1 muestreo de frutos para medir parámetros de calidad (Figura 1).



Figura 1. Línea del tiempo donde se muestra el transplante, los diferentes muestreos y las recolectas de fruto.

2.5. Medidas morfométricas

Con el fin de evaluar diferencias entre tratamientos en el crecimiento vegetativo de las plantas se llevó a cabo una serie de medidas morfométricas. Se evaluaron 15 plantas en cada tratamiento escogidas al azar y se tomaron las siguientes medidas (figura 2):

- ❖ Diámetros: se midió con un calibre digital el diámetro del tallo principal debajo de la primera bifurcación y en su base, justo encima del enarenado. También se midió en tres tallos desarrollados, a la altura de 1,5 m respecto del suelo medida con una cinta métrica.
- ❖ Altura de la planta: se midió la longitud del tallo principal, desde su base hasta la primera bifurcación a la que se le sumó la media de la longitud de los mismos tres tallos medidos anteriormente, desde la bifurcación hasta el ápice. Se utilizó una cinta métrica (cm).
- ❖ Número de entrenudos: se realizó un conteo del número de entrenudos en cada uno de los tres tallos seleccionados.
- ❖ Número de frutos: se contaron los frutos totales cuajados en toda la planta.

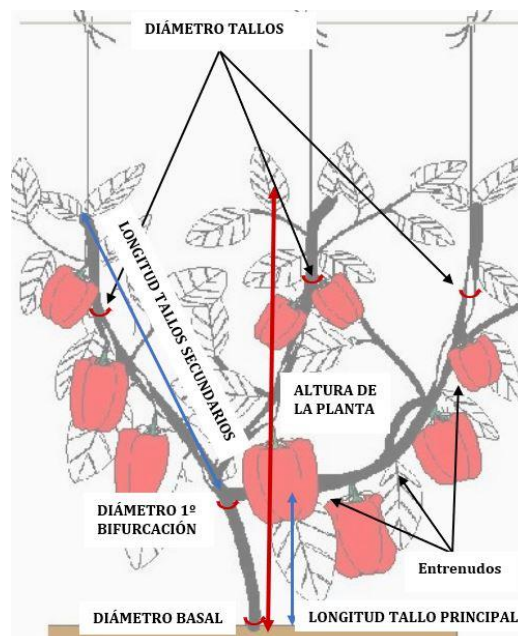


Figura 2. Esquema de los puntos de muestreo de las medidas morfométrica.

2.6. Medidas microbiológicas.

Para los análisis microbiológicos se realizaron 4 muestreos (ver fechas en Figura 1) en cada sector de los tratamientos, en 5 puntos fijos dentro de la zona del bulbo de regadío de los goteros, a una distancia de 10 cm de éstos y a una profundidad de 10 cm tras retirar la capa de arena. Se tomaron 25 g de suelo en tubos de rosca estériles de 20 ml.

Las muestras fueron enviadas para los análisis moleculares a la compañía Biome Makers Inc. La extracción de ADN fue realizada con un kit DNeasy PowerLyzer PowerSoil de Qiagen. Para la caracterización microbiana se estudió la región de codificación del rRNA 16S región V4 usando un secuenciador Illumina MiSeq instrument. Las lecturas de secuenciación se agruparon en OTUs con un 97% de similitud. La clasificación taxonómica de las secuencias se realizó usando la base de datos SILVA versión 132.

2.7. Análisis de fertilidad en suelos, hojas y frutos.

Para evaluar el efecto biofertilizante de los tratamientos se analizó el contenido NKP foliar, en frutos y suelos según las fechas de muestreo indicadas en la Figura 1.

De cada tratamiento se tomaron 45 hojas al azar del extracto apical que se llevaron al laboratorio y se dividieron en tres réplicas de 15 hojas cada una. Para el caso de los frutos, se recolectaron maduros y se separaron en 3 bandejas por tratamiento con 200 g de fruto cada una. Tanto las hojas como los frutos se lavaron con agua y, posteriormente, se enjuagaron con agua destilada para evitar todo tipo de residuos. Se secaron en una estufa a 68 °C durante 72 h y se trituraron con ayuda de un molinillo hasta reducirlos a polvo.

En el caso de los suelos, se tomaron 3 réplicas de unos 500g de suelo cada una. En el primer muestreo se recogieron en varios puntos del invernadero para obtener unos valores medios de los suelos del mismo. En el segundo y tercer muestreo de suelos se recogieron 3 réplicas de suelo por tratamiento en los mismos puntos de muestreo que en los microbiológicos. En todos los casos las muestras de suelos se guardaron en bolsas herméticas. En el laboratorio se secaron a temperatura ambiente y se retiraron las partículas mayores de 2 mm.

El contenido en Nitrógeno en suelos, hojas y frutos se determinó mediante el método de Kjeldhal (Bremner y Mulvaney, 1982), el fósforo con el método de Burriel y Hernando (1974) y el Potasio mediante absorción atómica con un espectrómetro 1100B Perkin Elmer.

2.8. Medidas de productividad

En cada tratamiento se seleccionó una fila fija de 10 plantas para realizar el seguimiento de la productividad del cultivo. Se tomaron 7 recolecciones (fechas en figura 1), coincidentes con los cortes realizados por el agricultor en el resto del invernadero, todas ellas en fase madura de los frutos (rojo) a excepción de una (verde). Los frutos se contaron y pesaron con una báscula portátil AE Adam® CKT48. Los datos se extrapolaron a kg/m² teniendo en cuenta la densidad de plantación.

2.9. Medidas de parámetros de calidad

2.9.1. Firmeza y espesor de la pared.

Se midió la firmeza en 3 frutos por tratamiento con el mismo grado de madurez y en el ecuador del fruto se tomaron 3 medidas con un penetrómetro PCE-PTR 200N con puntal de 8 mm de diámetro y superficie de 0.5 cm² con el objetivo de calcular la presión en Newton utilizada para que el puntal atravesase la pared del fruto. Por otro lado, también se midió el espesor de la pared de cada fruto en cada tratamiento, a la altura del ecuador del fruto con un calibre digital metálico.

2.9.2. °Brix o contenido total de sólidos solubles

Se licuaron 3 fracciones de frutos maduros de unos 200 g aproximadamente cada uno por cada tratamiento y el zumo obtenido se filtró con papel de filtro. El contenido de sales solubles se determinó en el zumo filtrado con un refractómetro manual Master Agri de ATAGO®

2.9.3. Acidez activa-pH

Se midió el pH del licuado con un pH-metro 1100-S de LAQUA®

2.9.4. Acidez valorable total

Se calculó el % de ácido cítrico en el zumo mediante una volumetría ácido-base con NaOH 0.1M y aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ ácido cítrico} = \frac{0.1 \frac{eq}{L} \times V_{titulación} (ml) \times \frac{1 L}{1000 mL} \times \frac{192.124 g}{3 eq}}{10 mL_{zumo}} \times 100 = V_{titulación} \times 0.064$$

2.9.5. Índice de madurez

Este índice (IM) es una estimación de la madurez del fruto. Se calcula como el cociente entre los °Brix y el % ácido cítrico.

2.10. Análisis de datos

Los datos obtenidos se ordenaron, tabularon y graficaron en Excel. En aquellas variables donde se midieron réplicas se evaluó si había diferencias significativas entre las medias de los diferentes tratamientos realizando un análisis de varianzas mediante una prueba ANOVA simple de una vía con el programa Statgraphics Centurion V 18.

Para los datos microbiológicos se realizó un análisis Ggeom patentado por Biome makers (EFS42339603, EFS41990852), donde se realizó un cálculo del cambio "fold" de cada OTU en cada tratamiento desde cada fecha de muestreo respecto a la fecha inicial vs el cambio en el tratamiento control (T1) en el mismo intervalo de tiempo estudiado en cada caso. Posteriormente, los OTUs son agrupados según su funcionalidad y puede estudiarse su influencia en la producción de fitohormonas y en el consumo y liberación de nutrientes para las plantas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Medidas morfométricas

Se encontraron diferencias significativas: diámetro de tallos a 150 cm, longitud de tallos, longitud de entrenudos, nº entrenudos y altura de la planta (Tabla 2).

Los resultados más destacados fueron que las plantas con aplicaciones recurrentes de los productos biofertilizantes (T3) presentaron mayor altura y una longitud entre nudos significativamente mayor que las plantas de los tratamientos sin biofertilizantes (T1) aunque, por otro lado, el diámetro de los tallos a 150 cm fue ligeramente menor. Estos resultados coinciden con el estudio realizado por Guillermo et al., (2018) en pimiento morrón donde la aplicación de *Pseudomas putida* incrementó significativamente la altura de las plantas, aunque por el contrario, en este mismo estudio, el diámetro de los tallos también fue significativamente mayor.

Tabla 2. Medidas morfométricas de plantas durante la época vegetativa.

VARIABLES	TRATAMIENTOS			ANOVA	
	T1	T2	T3	Razón-F	Valor-P
Diámetro basal (mm)	15,57 ± 1,39 a	15,66 ± 1,50 a	16,08 ± 1,37 a	0,55	0,5802
Diámetro 1º bifurcación (mm)	16,01 ± 1,48 a	16,17 ± 1,38 a	15,54 ± 1,57 a	0,73	0,4862
Diámetro tallos	8,97 ± 0,89 ab	9,26 ± 1,23 a	8,27 ± 1,35 b	2,84	0,0694 *
Longitud tallo principal (cm)	39,13 ± 5,33 a	38,80 ± 3,47 a	40,27 ± 3,39 a	0,51	0,6029
Longitud media tallos (cm)	132,20 ± 8,36 a	139,53 ± 13,41 ab	140,69 ± 9,88 b	2,75	0,0757*
Longitud media entrenudos (cm)	10,82 ± 0,70 a	10,73 ± 1,05 a	11,50 ± 0,92 b	3,28	0,0475**
Nº medio Entrenudos	12,36 ± 1,07 a	13,20 ± 1,89 b	12,38 ± 0,91 a	2,95	0,0633*
Nº medio Frutos	15,87 ± 3,20 a	15,40 ± 5,00 a	17,80 ± 3,28 a	1,58	0,217
Altura media de planta (cm)	171,33 ± 7,50 a	178,33 ± 12,95 ab	180,96 ± 9,61 b	3,52	0,0386*

T1: Sin aplicación de productos biofertilizantes. T2: Solo una aplicación de productos biofertilizantes. T3: Con aplicación periódica de productos biofertilizantes. Valores medios ± desviación típica de las medidas morfométricas, n=15. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. **p-value* <0.1 ***p value* <0.05 ****p value* <0.01.

3.2. Datos de producción

En la figura 3 pueden observarse los datos de producción acumulada a lo largo de los 7 cortes que se produjeron en este cultivo, todos en rojo, a excepción de uno en verde (el quinto), ya que el cultivo se iba a arrancar para establecer otro y no iba a dar tiempo de que los últimos frutos maduraran.

Es de destacar que, aunque el tratamiento T3 tuvo una producción menor durante los cortes iniciales e intermedios que el tratamiento control T1, al final la producción fue superior (T1: 11,8 kg/m² frente a T3: 13.1 kg/m²). Estos resultados finales han supuesto que el rendimiento en kg/m² ha sido un 11% superior debido a la aplicación de los productos biofertilizantes. Seguramente los resultados habrían sido incluso superiores si se hubiera permitido la maduración de todos los frutos y no se hubiera hecho un corte en verde.

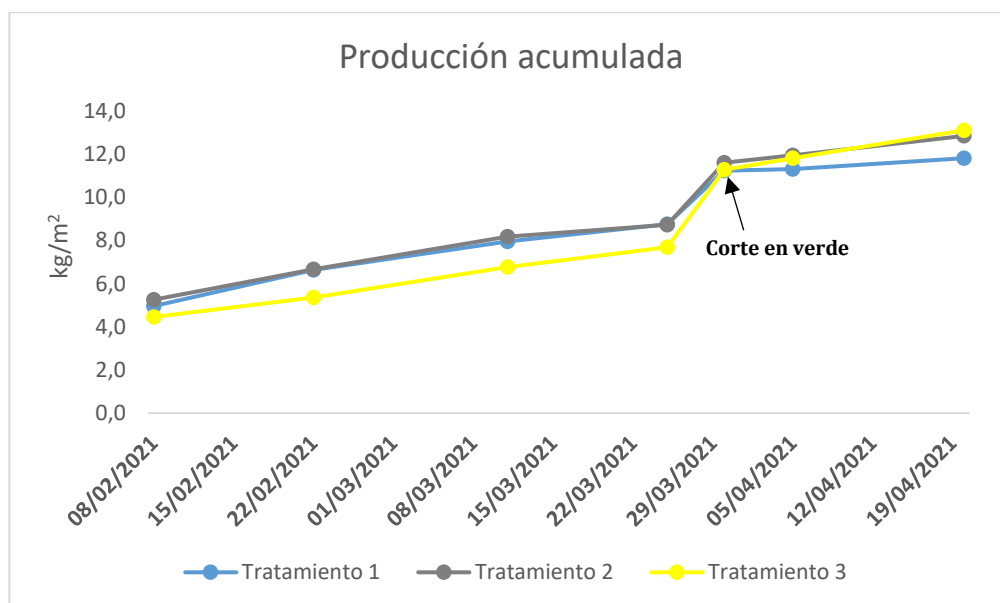
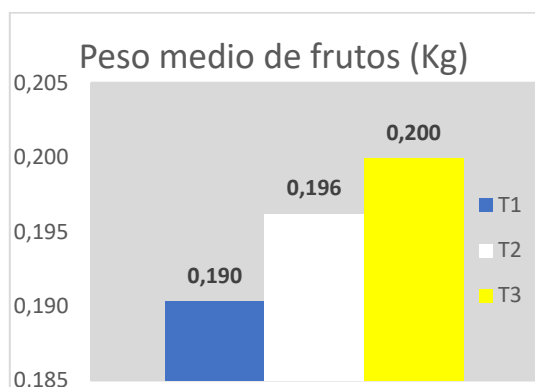


Figura 3. Producción acumulada. T1: Azul; T2: Blanco. T3: Amarillo.

El efecto periódico de las PGPM también se tradujo en un mayor número y peso de los frutos (5% en ambos casos) (Figura 4).



T1: Sin aplicación de productos biofertilizantes. T2: Solo una aplicación de productos biofertilizantes. T3: Con aplicación periódica de productos biofertilizantes. Valores medios del peso del fruto: n (T1) = 621, n (T2) = 655, n (T3) = 656.

Figura 4. Peso medio de frutos por tratamiento.

Otros estudios con PGPM han puesto de manifiesto que los aumentos de rendimiento y del número y tamaño de los frutos pueden deberse no solo a la capacidad para aumentar la solubilidad y absorción de nutrientes, sino también a su capacidad para sintetizar reguladores del crecimiento como hormonas vegetales, vitaminas o metabolitos como sideróforos, etc. (Hernández et al., 2018; Rana et al., 2015).

3.3. Datos de Calidad

Se han medido diferencias significativas para la firmeza y % ácido cítrico (Tabla 3). En ambos casos los resultados fueron inferiores en el tratamiento T3 que en el T1 y mientras que una menor dureza podría tener un comportamiento en postcosecha peor, en el caso del contenido en ácido cítrico los datos obtenidos estuvieron entre 0,34-0,40%, siendo en todo caso superiores a los óptimos indicados por Gómez y Abadalejo (1956), que oscilaban entre 0.15 y 0.28%.

Tabla 3. Parámetros de calidad de los frutos.

VARIABLES	TRATAMIENTOS			ANOVA	
	T1	T2	T3	Razón-F	Valor-P
<i>pH</i>	5,04 ± 0,06 a	5,06 ± 0,04 a	5,03 ± 0,05 a	0.26	0.7803
<i>° Brix</i>	8,00 ± 0,00 a	7,00 ± 0,50 a	7,33 ± 0,58 a	2.59	0.1691
<i>% Ácido cítrico</i>	0,40 ± 0,01 b	0,34 ± 0,02 a	0,34 ± 0,03 a	5.15	0.0611*
<i>IM</i>	20,16 ± 0,28 a	20,66 ± 0,69 a	21,76 ± 3,42 a	0.35	0.7183
<i>Firmeza (N)</i>	60,43 ± 7,13 b	52,40 ± 1,71 ab	49,00 ± 8,02 a	3.59	0.0600*
<i>Espesor de la pared (mm)</i>	5,75 ± 0,41 a	5,88 ± 0,46 a	5,76 ± 0,25 a	0.14	0.8684

T1: Sin aplicación de productos biofertilizantes. T2: Solo una aplicación de productos biofertilizantes. T3: Con aplicación periódica de productos biofertilizantes. Barras de error indican una desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. n=3. Valores medios ± desviación estándar de los parámetros de calidad, n=3. *p-value <0.1 **p-value <0.05 ***p-value <0.01

3.4. Análisis de fertilidad NPK

3.4.1. Análisis NPK suelos

El primer muestreo en suelos se realizó en varios puntos del invernadero obteniéndose unos valores medios comunes para todos los tratamientos. Por eso no se ha realizado un ANOVA en esa fecha. En lo referente a los contenidos en N (Figura 5) no hemos observado diferencias significativas entre tratamientos por lo que el efecto de las PGPM no ha quedado demostrado en los contenidos en este macronutriente en el suelo. Respecto a los niveles medidos, hemos comprobado como antes del trasplante y en el segundo muestreo (crecimiento vegetativo) los datos de % de N en suelo están dentro de los parámetros normales según Fernández et al. (2014). Sin embargo, en el último análisis el % es bajo lo que sugiere que el N está siendo absorbido casi en su totalidad por el cultivo en todos los tratamientos y no se está reponiendo por fertirriego, ya que en esta fase el programa de regadío va disminuyendo las cantidades.

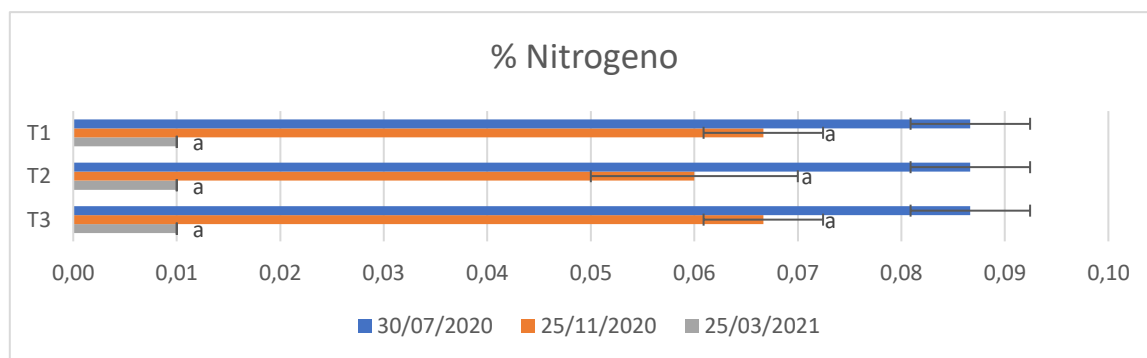


Figura 5. % de Nitrógeno en suelos en los diferentes muestreos y tratamientos

Para el caso del fósforo asimilable, los valores en un suelo de textura media franco-arenoso como el de este invernadero (58.69% arena, 22.64% limo y 18.52% arcilla), fueron bastante altos al inicio del experimento (Fernández et al., 2014). Posteriormente, los contenidos en P (Figura 6) fueron significativamente superiores en el tratamiento T3 frente al control (T1), lo que indica que las bacterias aportadas fueron especialmente efectivas. En un estudio similar (Teruelo, 2021), donde utilizaron los mismos productos en un cultivo de tomate, el efecto de las bacterias también fue bastante claro en incrementar los niveles de fósforo asimilable en suelo.

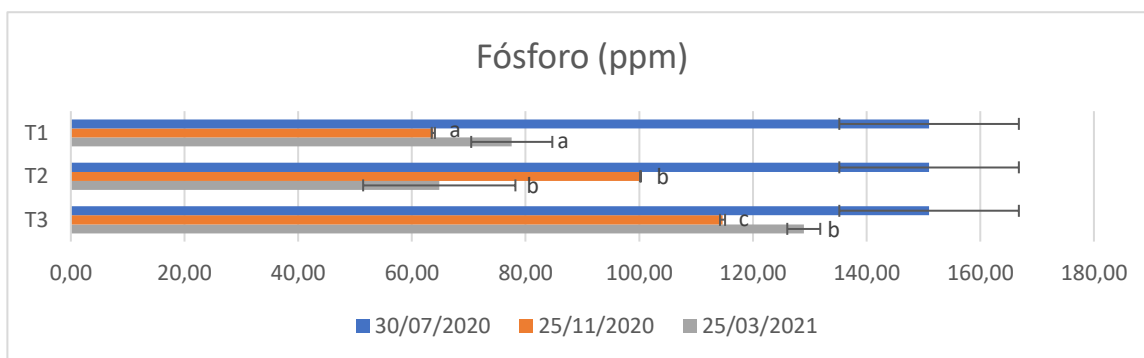


Figura 6. Contenido de Fósforo en suelos en los diferentes muestreos y tratamientos.

El potasio al inicio del cultivo se encontraba en niveles bastante altos según los valores indicados por Fernández et al., (2014) y han ido descendiendo por la absorción por las plantas y la disminución en fertirrigación (Figura 7). En este caso, los valores de K en suelos no se han visto mejorados por la acción de los biofertilizantes, aunque en el caso del estudio anteriormente mencionado de Teruelo (2021) estas bacterias también favorecieron los contenidos de K en el suelo en el cultivo de tomate.

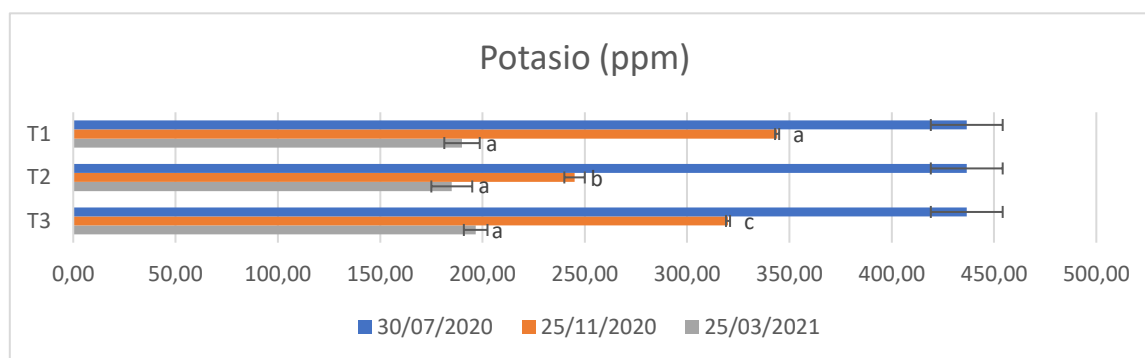


Figura 7. Contenido de Potasio en suelos en los diferentes muestreos y tratamientos

3.4.2. Análisis NPK de frutos y foliar

En el caso de los contenidos NPK en frutos los resultados han sido diferentes a los que hemos visto en suelos. Los niveles de potasio han sido significativamente superiores en el T3 con respecto al control T1 y no ha habido diferencias en los contenidos en fósforo (Tabla 4), comportamiento que también se repite en el análisis foliar (Tabla 5).

Tabla 4. Contenidos NPK en peso seco en frutos

NUTRIENTES	TRATAMIENTO			ANOVA	
	T1	T2	T3	Razón-F	Valor-P
% Nitrógeno (N)	1,86 ± 0,09 b	1,67 ± 0,07 a	1,62 ± 0,03 a	10,69	0,0105**
% Fósforo (P)	0,27 ± 0,01 a	0,27 ± 0,03 a	0,29 ± 0,01 a	1,33	0,3318
% Potasio (K)	2,25 ± 0,11 b	2,31 ± 0,03 ab	2,41 ± 0,07 a	3,26	0,0989*

T1: Sin aplicación de productos biofertilizantes.
T2: Solo una aplicación de productos biofertilizantes.
T3: Con aplicación periódica de productos biofertilizantes. Barras de error indican una desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas

Tabla 5. Contenidos en NPK en peso seco en hojas.

NUTRIENTES	TRATAMIENTO			ANOVA	
	T1	T2	T3	Razón-F	Valor-P
% Nitrógeno (N)	3,48 ± 0,05 ab	3,45 ± 0,03 b	3,54 ± 0,04 a	4,01	0,0785*
% Fósforo (P)	0,30 ± 0,02 a	0,32 ± 0,02 a	0,37 ± 0,06 a	2,82	0,1367
% Potasio (K)	3,53 ± 0,06 b	3,27 ± 0,05 c	3,80 ± 0,12 a	29,22	0,0008***

Parece claro que el producto Bio K ha sido especialmente efectivo en la mejora de los contenidos de macronutrientes en las hojas y frutos de las plantas. Esto coincide con el estudio llevado a cabo por Acosta (2018) quien comprobó que la aplicación de las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas en frijol tiene un importante efecto en la absorción de N y K en las hojas y no tanto en la solubilización de P.

Estos macronutrientes K y P, se encuentran en numerosas ocasiones en forma insoluble, no aprovechables por las plantas y difícilmente solubilizables. La literatura ha puesto en evidencia la acción de los biofertilizantes a base de microorganismos, en el papel de solubilización de dichos macronutrientes, describiendo sus mecanismos de actuación para la solubilización de éstos, entre los que se encuentra la acidificación del medio a través de la producción de ácidos orgánicos (Acosta, 2018; Corrales Ramírez et al., 2014). Las formas de fósforo inorgánico suelen ser apatitas, hidroxapatitas y oxiapatitas, y los microorganismos, por ejemplo, mediante la acidificación con ácido glucónico, pueden liberar al medio fosfatos y cationes que quedan disponibles para las plantas ya que son fácilmente asimilables. Además, también son capaces de degradar compuestos orgánicos como mediante la hidrólisis del fosfato con diferentes enzimas (Corrales Ramírez et al., 2014). Lo mismo ocurre en el caso del K, el cual los microorganismos son capaces de solubilizarlo desde sus formas inorgánicas illita o feldspatos a través de ácidos orgánicos como el ácido tartárico que parece el más efectivo en este tipo de solubilización (Acosta, 2018).

3.5. Análisis microbiológicos

En las Figuras 8, 9 y 10 se muestran las abundancias relativas de los filos bacterianos en los suelos para los tratamientos T1, T2 y T3 respectivamente. En general, en todos los tratamientos los filos mayoritarios fueron Proteobacterias, Firmicutes y Chloroflexi, con pocas diferencias entre tratamientos (< 5%) por lo que podemos indicar que no hubo importantes diferencias entre las comunidades bacterianas de los suelos.

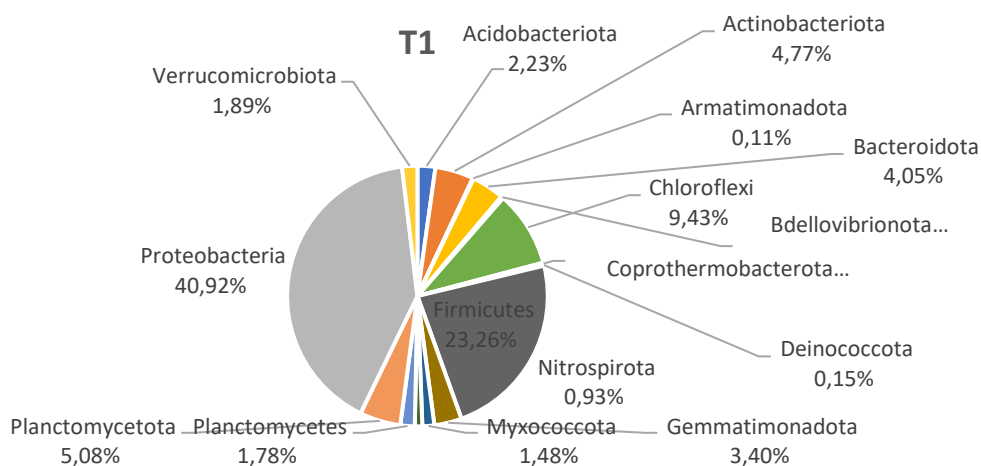


Figura 8. Abundancia relativa de los filos bacterianos para el tratamiento T1 (sin aplicación de biofertilizantes).

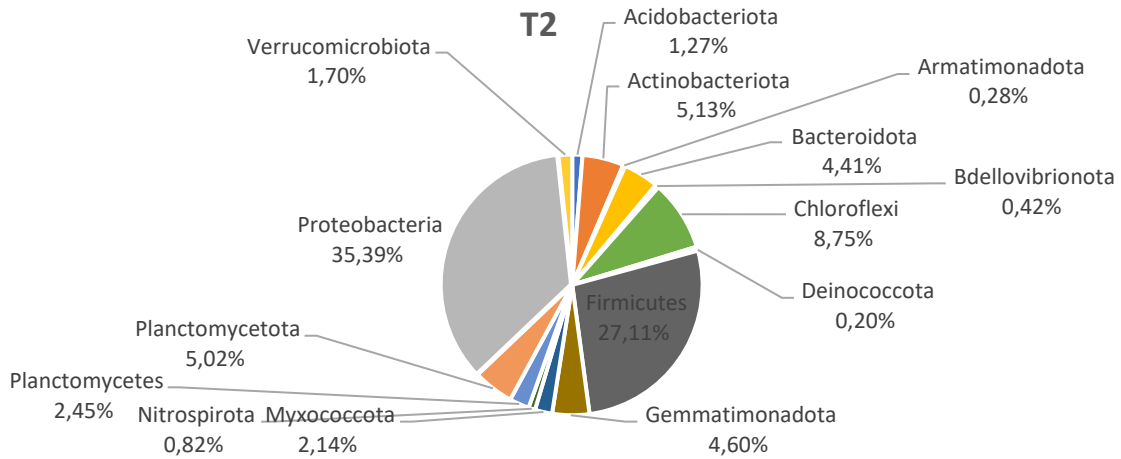


Figura 9. Abundancia relativa de los filos bacterianos para el tratamiento T2 (con aplicación de biofertilizantes una sola vez)

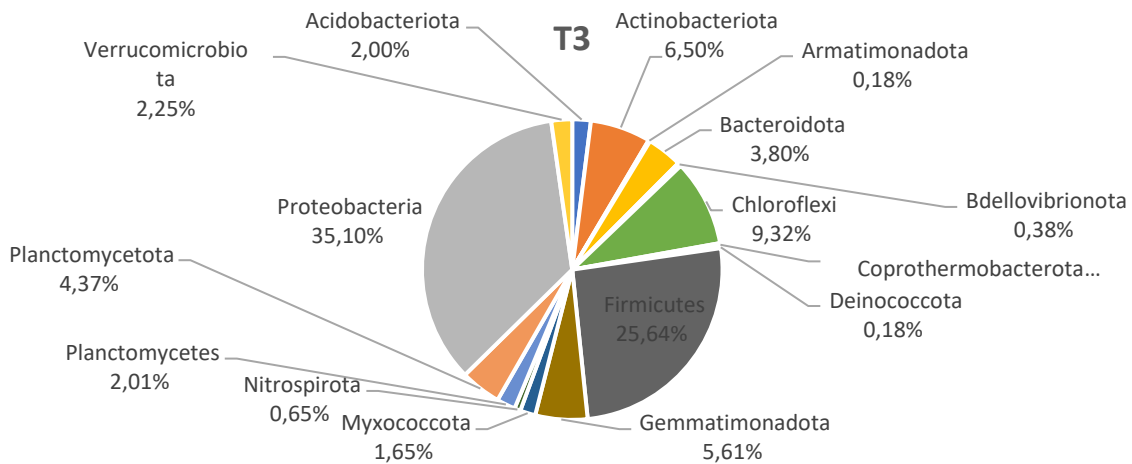


Figura 10. Abundancia relativa de los filos bacterianos para el tratamiento T3 (con aplicación de biofertilizantes periódicamente).

En la Figura 11 se muestran las proporciones de los géneros bacterianos más abundantes detectados en los suelos de los diferentes tratamientos. No hemos realizado un análisis detallado de los mismos ya que las técnicas microbiológicas aplicadas no nos permitían detectar las bacterias de los productos biofertilizantes respecto a otras bacterias del mismo género. Sin embargo, resulta de mayor interés el análisis Gheom (Tabla 6), el cual nos ha permitido conocer la presencia y variación en el tiempo de bacterias con influencia en los ciclos NPK y en la producción de fitohormonas responsables del crecimiento vegetal y desarrollo de los frutos. En este análisis se realizan comparaciones con el propio tratamiento y el control en el tiempo t0, así que las diferencias en el “folder change” pueden ser atribuidas a los productos biofertilizantes aplicados. Aunque tenemos datos de los diferentes muestreos nos centramos en el estudio del tratamiento T3 y en los cambios entre la época de producción de frutos y el inicio del experimento, que es la más interesante desde el punto de vista de la producción del cultivo.

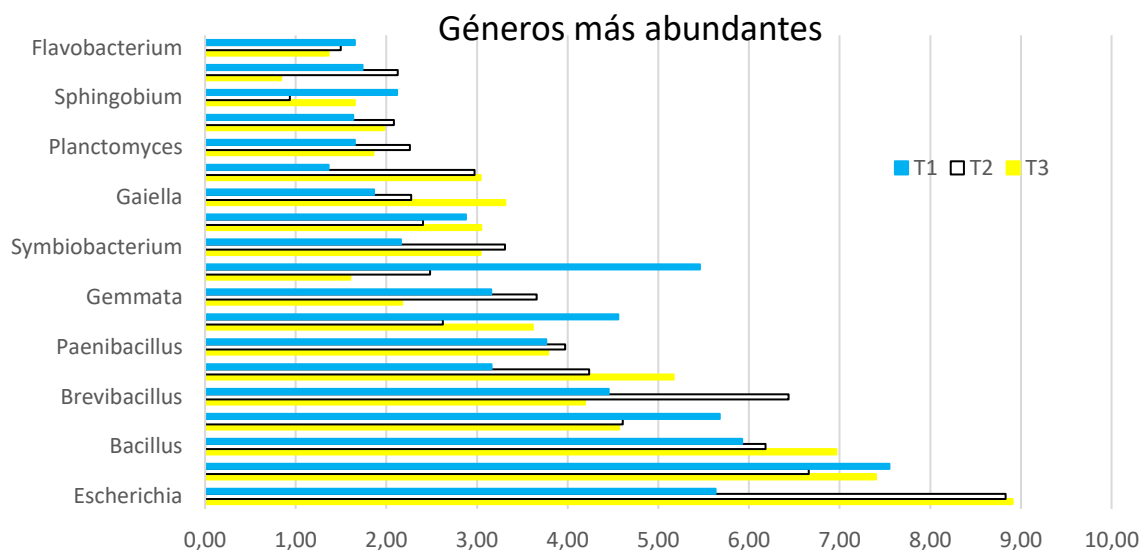


Figura 11. Géneros de microorganismos más abundantes por tratamientos. T1: Sin aplicación de productos biofertilizantes. T2: Solo una aplicación de productos biofertilizantes. T3: Con aplicación periódica de productos biofertilizantes.

Como se ve en la tabla 6 en el incremento de taxones microbiológicos relacionados con la producción de las fitohormonas citoquininas, giberelinas y ácido abscísico fue destacado (FC entre 81.78 y 237.48). Estas hormonas están implicadas en el crecimiento de las plantas y los frutos, y puede explicar claramente como este tratamiento ha conseguido unas producciones claramente superiores y frutos con peso medio superior a los del tratamiento control. Estos resultados fueron incluso mejores que los obtenidos por Teruelo (2021) en un ensayo similar en un cultivo de tomate, donde los valores con relación a la producción de fitohormonas fueron inferiores.

HORMONES	t1-t0		t2-t0		t3-t0	
	Folder Change (FC)	p-value	Folder Change (FC)	p-value	Folder Change (FC)	p-value
Hormone Production	21,52	0,70	-22,00	0,68	62,82	0,51
Auxin Production (IAA)	10,30	NA	-38,62	0,57	37,51	0,68
Cytokinin Production (CK)	31,90	0,69	-14,48	NA	102,86	0,49
Gibberellin Production (GA)	37,51	0,68	9,41	NA	81,78	0,51
Abscisic acid (ABA)	526,05	0,24	379,05	0,32	237,48	0,50
NUTRITION	Folder Change (FC)	p-value	Folder Change (FC)	p-value	Folder Change (FC)	p-value
Nitrogen Pathways	10,85	0,64	28,13	0,43	68,95	0,03
Inorganic nitrogen release	46,06	0,14	83,63	0,02	92,84	0,02
Inorganic nitrogen consumption	31,70	0,10	43,08	0,03	16,37	0,32
Inorganic Nitrogen cycle health	-7,79	0,67	-4,68	NA	-15,23	0,49
Phosphorous Pathways	-22,04	0,64	1,42	NA	22,19	0,64
Inorganic P solubilization	-22,12	0,52	4,64	NA	20,49	0,62
Inorganic P consumption	-1,76	NA	-1,11	NA	-11,87	0,14
Organic P assimilation	-14,02	0,14	-22,74	0,02	-22,08	0,02
Potassium Pathways	-13,53	0,64	23,31	0,64	7,99	NA
Potassium solubilization	-22,12	0,52	4,64	NA	20,49	0,62
Potassium consumption	-11,39	0,33	-18,57	0,13	-0,08	NA

Tabla 6. Análisis microbiológico Gheom del tratamiento T3.. t0, t1, t2, t3 indican las fechas de muestreos microbiológicos.

Esto está de acuerdo con Rana et al (2015) que encontraron que las PGPM en arroz indujeron los incrementos de estas fitohormonas y desarrollaron una mayor producción en los cultivos. Aunque otros estudios, también apuntan la posibilidad de que se deba a la mejor movilización de nutrientes propiciada por el crecimiento de las raíces, a consecuencia de estos microorganismos (Moreno Reséndez et al., 2018).

En lo referente a los macronutrientes, los factores en los que están más implicados las PGPM son los que se refieren en la tabla 6 como liberación de N inorgánico y solubilización de P y K. De estos, obtuvimos incrementos en la solubilización de P y K (FC en torno a 21), lo que corrobora los resultados de fertilidad en suelos, hojas y frutos. Por otro lado, aunque en la liberación de N se produjo un incremento superior (FC = 92.84) no se han producido mejoras significativas en los contenidos de N en suelos, hojas y frutos. Esto tiene su explicación en que las bacterias incluidas en el producto Bio N realizan la fijación de N atmosférico, no la mineralización de N orgánico y aunque se hayan producido incrementos en taxones que se especialicen en esta función y que ya deberían estar presentes en los suelos, los suelos de invernadero son bastante pobres en materia orgánica, por lo que no han podido incrementar los niveles de N, mediante la mineralización de esta.

Así hemos comprobado la acción de las bacterias aplicadas en el ensayo, en especial para el P y el K y su posible acción en la producción de fitohormonas. Por esto pensamos que su efecto promotor del crecimiento en el cultivo es debido a su efecto en la mejora de la disponibilidad de nutrientes y, además por su acción productora de hormonas implicadas en el crecimiento de las plantas. Esto también explicaría por qué los pesos medios de los frutos en el tratamiento T3 fueron un 5% superior al del tratamiento T1.

4. CONCLUSIONES

- La aplicación de los productos biofertilizantes basados en microorganismos promotores del crecimiento vegetal resultó en plantas más grandes durante la fase de crecimiento vegetativo, lo que a su vez redundó en mayores producciones de frutos (11% más de producción en el tratamiento con biofertilizantes respecto al control).
- El poder biofertilizante en suelos, hojas y frutos de los productos comerciales utilizados fue especialmente interesante para el fósforo asimilable y el potasio.
- Los biofertilizantes no tuvieron un efecto positivo en los parámetros de calidad clásicos medidos en los frutos.
- Los análisis microbiológicos demostraron que los mecanismos de solubilización de P y K se vieron mejorados en los suelos en el tratamiento con biofertilizantes en la fase de la época de recolección de frutos frente al control y a si mismo respecto a la fase de inicio del experimento. Además, los resultados indicaron que los productos biofertilizantes han podido influenciar el desarrollo de fitohormonas relacionadas con el crecimiento vegetal, lo cual se corrobora con la producción de frutos un 5% más pesados en el tratamiento con microorganismos promotores del crecimiento frente al control.
- Aunque también se ha incluido en este estudio un tratamiento en el que solo se inocularon los productos biofertilizantes una vez, los resultados en los distintos apartados han sido muy dispares. Sospechamos que ha podido haber algún error de sobre fertilización en fertirriego y/o biofertilizantes, por lo que no se ha procedido a analizar los resultados en el texto de este trabajo.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, M. (2018). Universidad Nacional Agraria La Molina Universidad Nacional Agraria La Molina". *Universidad Nacional Agraria La Molina*, 2020.
- Bremner, J.M., Mulvaney, C.S., (1982). Nitrogen-total. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, pp. 595–624.
- Burriel, F., Hernando, V., (1974). Nuevo método para determinar el fosforo asimilable en los suelos. *Anal Edaf. Fisiol. Veg.* 9, 611–622.
- Corrales Ramírez, L. C., Arévalo Galvez, Z. Y., & Moreno Burbano, V. E. (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Nova*, 12(21), 67.
- Fernández, M. M., Aguilar, M. I., Carrique, J. R., Tortosa, J., García, C., López, M., & Pérez, J. M. (2014). Suelo y Medio Ambiente. In *Suelos y medio ambiente en invernaderos*.
- Hassan, S. M., & Abd Alhafez, Z. A. (2016). Efficiency of plastic cover types on essential oil composition and vegetative growth of dill (*Anethum graveolens* L.). *Acta Horticulturae*, 1134, 301–307.
- Hernández, G., Chiquito, R., Castillo, D., Chiquito, C., Vidal, L., & Beslstrán, F. (2018). Effect of microcapsules of *Pseudomonas putida* on growth and yield of red pepper. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 20, 4223–4233.
- Mesas, R. (2014). *Utilización de bacterias endófitas en el desarrollo de plántulas de pimiento* (p. 90).
- Moreno Reséndez, A., García Mendoza, V., Reyes Carrillo, J. L., Vásquez Arroyo, J., & Cano Ríos, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68–83.
- Ortega, R., Domene, M. A., Soriano, M., Sánchez-Marañón, M., Asensio, C., & Miralles, I. (2020). Improving the fertility of degraded soils from a limestone quarry with organic and inorganic amendments to support vegetation restoration with semiarid Mediterranean plants. *Soil and Tillage Research*, 204(May), 104718.
- Pedraza, R. O., Teixeira, K. R. S., Scavino, A. F., De Salamone, I. G., Baca, B. E., Azcón, R., Baldani, V. L. D., & 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.
- Rana, A., Kabi, S. R., Verma, S., Adak, A., Pal, M., Shivay, Y. S., Prasanna, R., & Nain, L. (2015). Prospecting plant growth promoting bacteria and cyanobacteria as options for enrichment of macro- and micronutrients in grains in rice–wheat cropping sequence. *Cogent Food & Agriculture*, 1(1), 1037379.
- Rincón, L. (2005). El uso de biofertilizantes en la fertilización nitrogenada de los cultivos hortícolas. *Revista Agropecuaria*, 74 (2005)(879), 788–792.
- Stalin Rivera Figueroa, J. (2016). *Universidad técnica estatal de Quevedo facultad de ciencias agrarias carrera de ingeniería agrónoma Portada Proyecto de Investigación Previo a la Obtención del Título de Ingeniero agrícola*.
- Stewart, W.M. (2013). Consideraciones en el uso eficiente de nutrientes. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.
- Teruelo (2021). Uso de biofertilizantes como una herramienta para mejorar la productividad y la calidad de un cultivo intensivo de tomate. Trabajo fin de grado en Ingeniería Agrícola. Universidad de Almería.
- <https://www.infoagro.com/hortalizas/pimiento.htm> **03/05/2021**
 - <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/observatorio/servlet/FrontController?ec=default> **03/05/2021**