

Universidad de Almería, España
Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria
Pedro Antonio Mejía Guerra



Efecto de la aplicación de té de vermicompost y microorganismos promotores del crecimiento de plantas (PGPMs) en la composición y funcionalidad de la microbiota rizosférica de cultivo orgánico de melón

Tutores

Dr. Joaquín Moreno Casco

Dra. López López, María Josefa

Curso 2016/2017, convocatoria junio 2017

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Situación actual.....	2
1.2. Té de vermicompost.....	2
1.3. Microorganismos promotores de crecimiento de plantas (PGPMs).....	3
1.3.1. Bacterias (PGPBs).....	5
1.3.2. Hongos asociados a raíces y micorrizas.....	5
1.4. Objetivos.....	7
2. MATERIAL Y METODOS.....	7
2.1. Sustrato de cultivo, Té de vermicompost y PGPMs	7
2.1.1. Sustrato empleado.	7
2.1.2. Preparación del té de vermicompost	9
2.1.3. PGPMs comerciales	10
2.2. Cultivo de melón y tratamientos.....	11
2.2.1. Localización y manejo agronómico del cultivo de melón	11
2.2.2. Manejo de riego y nutrición.....	12
2.2.3. Tratamientos y muestreos de rizosfera	13
2.3. Medidas analíticas: Análisis microbianos.....	13
2.3.1. Muestras y preparación de muestras	13
2.3.2. Bacterias y hongos totales	14
2.3.3. Solubilizadores de fosfatos.....	15
2.3.4. Fijadores de nitrógeno	16
2.3.5. Nitrificantes y amonificantes	16
2.4 Análisis estadístico.....	18
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
3.1. Composición microbiana del té de vermicompost.....	18
3.2. PGPMs comerciales aplicados en cultivo	21
3.3. Efecto de tratamientos PGPMs y Té en microbiota rizosférica.....	22
4. CONCLUSIONES	27
AGRADECIMIENTOS	28
BIBLIOGRAFÍA.....	28

RESUMEN

La FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) establece en su principio número 1 “Mejorar la eficacia en el uso de los recursos es crucial para la sostenibilidad de la agricultura”, que se tienen que desarrollar nuevas formas amigables para producir alimentos que sean económicamente rentables, socialmente responsables y ambientalmente seguras. El objetivo principal del presente trabajo de investigación fue determinar el impacto de la aplicación de un té de vermicompost y diferentes PGPMs (Microorganismos promotores del crecimiento de las plantas) comerciales en cultivo orgánico de melón en la microbiota rizosférica. El melón se cultivó sobre un sustrato orgánico constituido por 40% de vermicompost (V) y 60% de fibra de coco (FC), y se evaluaron al inicio y final de los tratamientos la carga microbiana total (Bacterias totales, Hongos totales) y funcional (solubilizadores de fosfatos, fijadores de nitrógeno y nitrificantes). Además, se evaluó la composición microbiana del té empleado en el riego del cultivo en los distintos tratamientos, así como su variación en distintos lotes de producción. Los resultados obtenidos indicaron que la microbiota total se incrementa como consecuencia del riego con té de vermicompost, que aporta bacterias y hongos, así como grupos microbianos funcionales con actividad biofertilizante. Además, dicha población no varía sustancialmente entre distintos lotes de producción. Adicionalmente, resulta favorable la aplicación de PGPMs con bacterias para incrementar los fijadores de nitrógeno y de PGPMs con micorrizas para aumentar los solubilizadores de fosfatos. Los resultados de esta investigación demuestran que el té de vermicompost y PGPMs son alternativas viables dentro de un proceso de agricultura sostenible enfocada en reducir la contaminación de fuentes de agua, fortalecer los programas de gestión de residuos para convertir a recursos, producir alimentos saludables, nutritivos y con más sabor.

Palabras clave: Biofertilizantes, te de vermicompost, *Trichoderma*, Micorrizas, PGPMs

ABSTRACT

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), states in its number 1 principle: “Improving resource efficiency is crucial for the sustainability of agriculture”, new friendly ways must be developed to produce economically profitable, socially responsible and environmentally safe food. The main objective of this research was to determine the impact of the application of a vermicompost tea and different commercial PGPMs on organic melon crops in the rhizospheric microbiota. The melon was cultivated on an organic substrate consisting of 40% vermicompost (V) and 60% coconut fiber (FC), and the total microbial load (Total Bacteria and Fungi) and functional one (phosphate solubilizers, nitrogen fixers and nitrifiers) were evaluated at the beginning and the end of treatments. In addition, the microbial composition of the tea used in the irrigation of the crop in the different treatments was evaluated, as well as its variation in different batches of production. The results obtained indicated that the total microbiota is increased as a consequence of irrigation with vermicompost tea, which provides it with bacteria and fungi, as well as functional microbial groups with biofertilizer activity. Besides, the upper mentioned population does not vary substantially between different batches of production. Moreover, it is favorable to apply PGPMs with bacteria to increase nitrogen fixers and PGPMs with mycorrhizae to enhance phosphate solubilizers. The results of this research demonstrate that vermicompost tea and PGPMs are viable alternatives in a sustainable agricultural process aiming to reduce the pollution of water sources, strengthen waste management programs to convert it into resources, produce healthy, nutritious and more flavourful food..

Keywords: Biofertilizers, Vermicompost Tea, *Trichoderma*, Mycorrhizas, PGMPs

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Situación actual

La creciente demanda global de alimentos para abastecer a la población mundial en aumento, sin comprometer los recursos naturales para las futuras generaciones, representa uno de los mayores retos para la Ciencia Agrícola. La agricultura intensiva ha contribuido al aumento en el abastecimiento de alimentos, pero ha alcanzado un punto crítico en el que sus impactos negativos están contribuyendo al cambio climático global y a la pérdida de muchos ecosistemas (FAO, 2012; FAO, 2016). Por ello, la agricultura actual debe enfocarse en la búsqueda de nuevas técnicas de producción agrícola sostenible, que sean eficientes en el aprovechamiento y en el uso razonable de los recursos disponibles, y que sean ambientalmente amigables.

La gestión adecuada de los residuos agrícolas constituye otro aspecto importante a resolver en el marco de la producción agrícola, debido a los impactos negativos que están ocasionando al medio ambiente y a la pérdida de recursos derivada de su eliminación sin aprovechamiento. A modo de ejemplo, la provincia de Almería constituye la mayor área de cultivo en invernaderos de Europa, con 26,000 ha de cultivo de vegetales, con una generación anual estimada de 1.751.242 toneladas de residuos vegetales, los cuales transformados a peso seco suponen 235.544 toneladas de biomasa (López, et al., 2014a). El potencial de este material transformado de residuo a recurso a través de procesos tales como el compostaje o el vermicompostaje, podría generar muchos beneficios en el sistema agrícola, incluyendo la disminución del uso de fertilizantes químicos y su sustitución por biofertilizantes, así como la reducción de la contaminación ambiental y un mayor balance ecológico en el sistema.

1.2. Té de vermicompost

Los extractos acuosos obtenidos a partir de compost y vermicompost reciben el nombre de tés. Estos derivados están teniendo una gran aceptación, principalmente en la agricultura orgánica, por la mayor facilidad de aplicación que los productos sólidos a partir de los que se obtienen y por sus buenas cualidades agronómicas (Scheuerell y Mahaffee, 2002; Arancon et al., 2007). Los tés empleados en la actualidad, son productos obtenidos por extracción líquida que dan lugar a la disolución de moléculas orgánicas e inorgánicas, muchas de ellas bioactivas, y a la suspensión y crecimiento de microorganismos que mejoran el crecimiento y la salud de la planta, y que en conjunto provocan efectos positivos en los cultivos (Ingham, 1999; Pane et al., 2014).

El té de vermicompost, como su nombre indica, se obtiene de vermicompost. Este último se ha descrito como un excelente enmendador de suelos y agente de biocontrol; asimismo, es considerado uno de los mejores fertilizantes orgánicos y más eco-amigable en comparación con los fertilizantes químicos (Joshi et al., 2015). Adicionalmente, al ser producido mediante transformación de residuos, principalmente agrícolas, que pueden retornar al sistema, su producción se enmarca en las premisas de la agricultura sostenible. El vermicompost se obtiene mediante un proceso denominado vermicompostaje, en el que

la materia orgánica contenida en residuos es transformada mediante la acción combinada de lombrices, principalmente de la especie *Eisenia fetida*, y microorganismos en condiciones aeróbicas y mesófilas. En este proceso las lombrices consumen y fragmentan los residuos orgánicos en partículas finas, las cuales pasan por su tracto digestivo, en el cual, además de actuar las enzimas digestivas de la lombriz, lo hacen los microorganismos presentes en el digestivo. Este proceso combinado acelera la transformación de la materia orgánica, incrementa la microbiota y estabiliza la materia orgánica dando lugar a un producto humificado con unas buenas características nutricionales y fisicoquímicas (Sinha et al., 2013). El vermicompost es rico en elementos nutritivos, aunque su mayoría se encuentran en forma orgánica (López, et al., 2014b). Además de aportar macronutrientes como N (23%), K (1,85-2,25%) y P (1,55-2,25%), es una fuente de micronutrientes, e incluye microorganismos beneficiosos para el suelo, así como enzimas y hormonas que estimulan el crecimiento de las plantas (Sinha, et al., 2010; Burnet, et al., 2016). Es, por tanto, considerado un eficiente suplemento orgánico para suelo y cultivos hortícolas en contenedor con sustrato (Sarma et al., 2010). Varios estudios de investigación demuestran resultados positivos en producción y aportes nutricionales al cultivo (Atiyeh, et al., 2001; Anilkumar, et al., 2007; Zulkarami, et al., 2010; Manh y Wang, 2014; Mendoza-Hernandez, et al., 2014;). En la Tabla 1 se especifican algunas de las funcionalidades del vermicompost, así como las ventajas derivadas de su empleo en cultivos.

Los té de vermicompost se obtienen mediante una amplia variedad de métodos, aunque todos ellos comienzan con la mezcla del vermicompost con agua en proporciones que van de 1:3 (33%) a 1:200 (0,5%). Algunos de los procesos de tratamiento posteriores a la mezcla son aireados, mientras que otros no, y la extracción se prolonga de 12 h a tres semanas. Adicionalmente, en algunos casos se incorporan nutrientes tales como melazas, polvo de algas o extractos de levadura al objeto de promover la actividad y el crecimiento de los microorganismos durante el proceso extractivo (Arancon et al., 2007).

Tabla 1. Ventajas del uso de vermicompost y compost (Sarma et al., 2010;Joshi et al., 2015).

FUNCIONALIDAD	PROPIEDADES
Modulador del crecimiento en plantas	<ul style="list-style-type: none"> • Mejora el consumo de nutrientes por la planta. • Presencia de microbiota promotora del crecimiento de plantas. • Presencia de fracciones húmicas. • Contenido en reguladores de crecimiento de plantas. • Respuesta específica por cultivar.
Supresor de enfermedades de plantas	<ul style="list-style-type: none"> • Componentes de extractos supresores. • Comunidad microbiana supresora. • Fortificación e inducción de resistencia mediada por la microbiota. • Modula la comunidad microbiana y la supresión de la enfermedad. • Compuestos húmicos supresores. • Supresión de nematodos parásitos de plantas • Supresión de plagas al aplicar té vermicompost en hojas (Nath y Singh, 2012)

1.3. Microorganismos promotores de crecimiento de plantas (PGPMs)

Los microorganismos promotores del crecimiento de plantas, PGPMs, por las siglas en inglés (Plant growth promoting microorganisms) estimulan el crecimiento de las plantas

mediante mecanismos directos o indirectos. Incluyen bacterias y hongos constituyentes de la microbiota rizosférica que establecen relaciones beneficiosas con las plantas y que, a su vez, reciben nutrientes por parte de la planta. La promoción directa del crecimiento de la planta es efectuada por su capacidad para solubilizar nutrientes y micronutrientes, producir reguladores del crecimiento de la planta (hormonas), suprimir o controlar la producción de hormonas del estrés (etileno) y mejorar el consumo de agua y nutrientes; entre éstos se incluyen microorganismos fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfatos, productores de sideroforos, etc. Entre los mecanismos de acción indirecta destacan la inhibición de patógenos mediante la producción de antibióticos y enzimas hidrolíticas de pared celular (quitinasas), y la inducción el sistema de defensa en plantas (Abhilash et al., 2016).

La mayoría de los PGPMs presentan varios modos de acción como son bioestimulación, bioprotección, biorremediación y nutrición. En la Figura 1 se presenta una clasificación general de PGPMs de acuerdo a su modo de acción y al tipo de microorganismo. De acuerdo a este último criterio, se consideran bacterias, que se dividen en intra y extracelulares según crezcan o no dentro de las células vegetales; hongos asociados a las raíces; y hongos micorrízicos que son un tipo especial de hongos, los cuales a su vez pueden presentar dos tipos de asociaciones con las plantas (ecto y endo micorrizas o arbusculares).

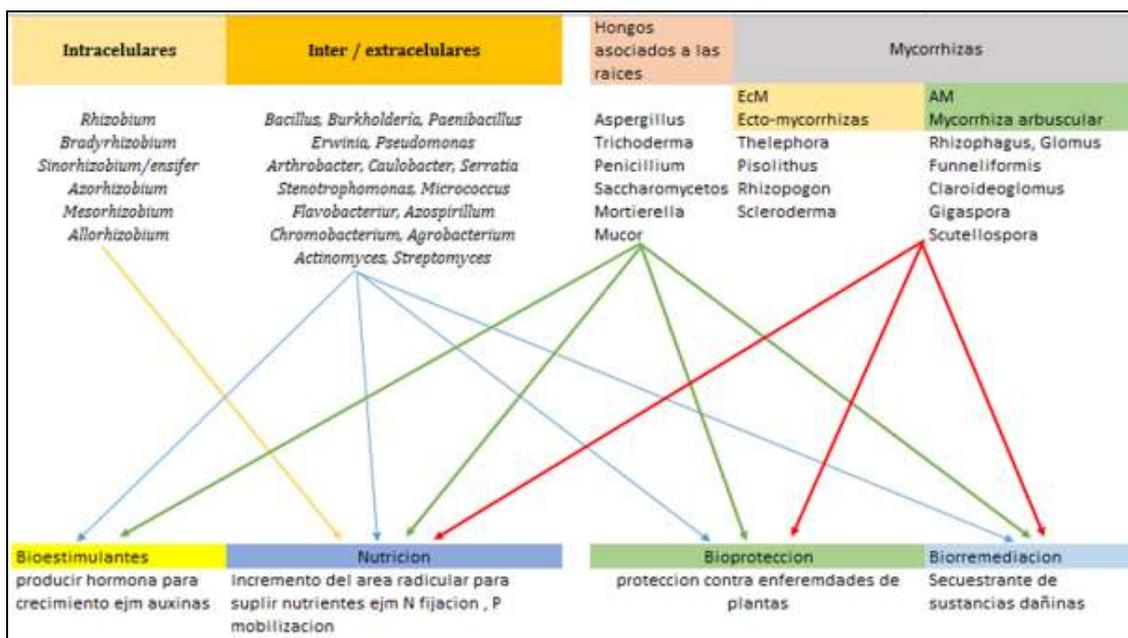


Fig. 1. Principales PGPMs (Owen et al., 2015).

La “Biofertilización” consiste en aumentar el número de microorganismos (PGPMs) de un suelo o sustrato (Bioaumentación), para así, acelerar los procesos microbianos beneficiosos y aumentar los nutrientes asimilables por la planta. La bioaumentación ayuda a una fertilización racional, reduciendo el uso de energía por la planta para absorber los nutrientes, disminuye la degradación del agro ecosistema y reduce la pérdida de nutrientes del suelo por lixiviación, principalmente de nitrógeno (Acea, et al., 2003; Martínez, et al., 2013; Agbodiato, et al., 2015).

1.3.1. Bacterias (PGPBs)

Las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas pueden desarrollarse en el interior (intracelulares) o exterior (extracelulares) de las células vegetales. En el primer caso suelen formar nódulos, y en el segundo, no forman nódulos, viven fuera de la planta, aunque algunas pueden crecer dentro del tejido de la planta en los espacios intercelulares. Estas bacterias presentan los siguientes mecanismos de acción para estimular el crecimiento de la planta:

1. Producen de hormonas, antibióticos y enzimas (Gray y Smith, 2005)
2. Estimulan simbiosis microbianas (ej. micorrizas) (Antoun y Prevost, 2005)
3. Mejoran la nutrición de la planta, especialmente Nitrógeno y Fosforo
4. Reducen los niveles de etileno en la planta.
5. Activan la resistencia sistémica inducida.

1.3.2. Hongos asociados a raíces y micorrizas

Los hongos pueden residir en la rizosfera, en el rizoplasma o inclusive algunos dentro de los tejidos de las raíces. Confieren efectos beneficiosos a la planta a través de muchos mecanismos:

1. Intervienen en procesos de transformación de la materia orgánica y producción de enzimas (Cano, 2011; Kowalska, et al., 2014; Pascale, et al., 2017;).
2. Estimulan el crecimiento de plantas y la fotosíntesis (Shu-Ying, et al., 2016).
3. Inducen resistencia a enfermedades y tolerancia a estrés abiótico (Rawat y Tewari, 2011).
4. Sintetizan auxinas que estimulan el desarrollo lateral de raíces (ej. *Trichoderma*) (Benitez et al., 2004).
5. Modifican la síntesis de óxido nítrico en el hospedero bajo condición de ataque de patógenos (*Trichoderma*) (Gupta et al., 2000).
6. Realizan funciones de Biocontrol y Bioremediación (Rodríguez et al., 2009).
7. Solubilizan fosforo inorgánico y mineralizan fosforo orgánico, ej. *Aspergillus* y *Penicillium* secretan ácidos orgánicos que solubilizan fósforo (Barrow y Osuna, 2002).

Las micorrizas se diferencian de los hongos asociados a raíces por la extensa red de hifas que producen en el suelo, las cuales actúan como una extensión del sistema radicular de las plantas hospederas. Los hongos micorrizicos arbusculares (AMF) constituyen un grupo de biotrofos obligados de raíces que establecen intercambios de beneficios mutuos con el 80% de las plantas existentes, son considerados como biofertilizadores naturales. Estos hongos, aunque presentes en casi todo el planeta, no pertenecen más que a 6 géneros y alrededor de un centenar de especies. Esta asociación incrementa la absorción de nutrientes y agua, mejora el crecimiento, florecimiento y rendimiento de las plantas, así como su resistencia frente al estrés medioambiental, sequía y patógenos. Adicionalmente reducen el shock por trasplante y proporcionan efectos positivos directos al suelo, tales como, la mejora de la consistencia de las partículas, la reducción de la erosión o el aumento de la capacidad de mantener agua en el suelo (Berruti et al., 2016).

Existen dos tipos de hongos micorrízicos en función de que se desarrollen fuera o dentro de los tejidos radiculares, ectomicorrizas y endomicorrizas, ambos comercialmente explotados en agricultura y silvicultura (Owen et al., 2015). En las ectomicorrizas (EcM) los tejidos fúngicos forman una vaina envolvente de la raíz vegetal llamada manto fúngico. El hongo crece rodeando las células de la raíz, formando una estructura llamada "red de Hartig" (Fig. 2). Las hormonas que secreta el hongo provocan la ramificación de la raíz y los pelos absorbentes a menudo están ausentes, siendo reemplazados por las hifas fúngicas. En las endomicorrizas se produce penetración inter e intracelular de los tejidos radiculares por el hongo. El micelio invade la raíz, primero intercelularmente y luego penetra en el interior de las células radicuales. Las hifas forman unas estructuras dendroides llamadas arbusculos (A) o protuberancias llamadas vesículas (V) (Fig. 2). Las endomicorrizas se suelen llamar micorrizas HMV o HMA por la formación de estas estructuras. Las hifas se extienden varios centímetros por fuera de la raíz, incrementando la absorción de nutrientes. El intercambio entre hongo y hospedante tiene lugar en los arbusculos, que se llenan de gránulos de fosfatos. Entre los HMAs sobresalen los simbiontes obligados *Glomus intraradices* y *Glomus mosseae*, ambos reportados como HMA que incrementan el consumo de fosforo en diversos cultivos (Klironomos, Moutoglis, 2008; Williams et al., 2012; Cozzolino et al., 2013).

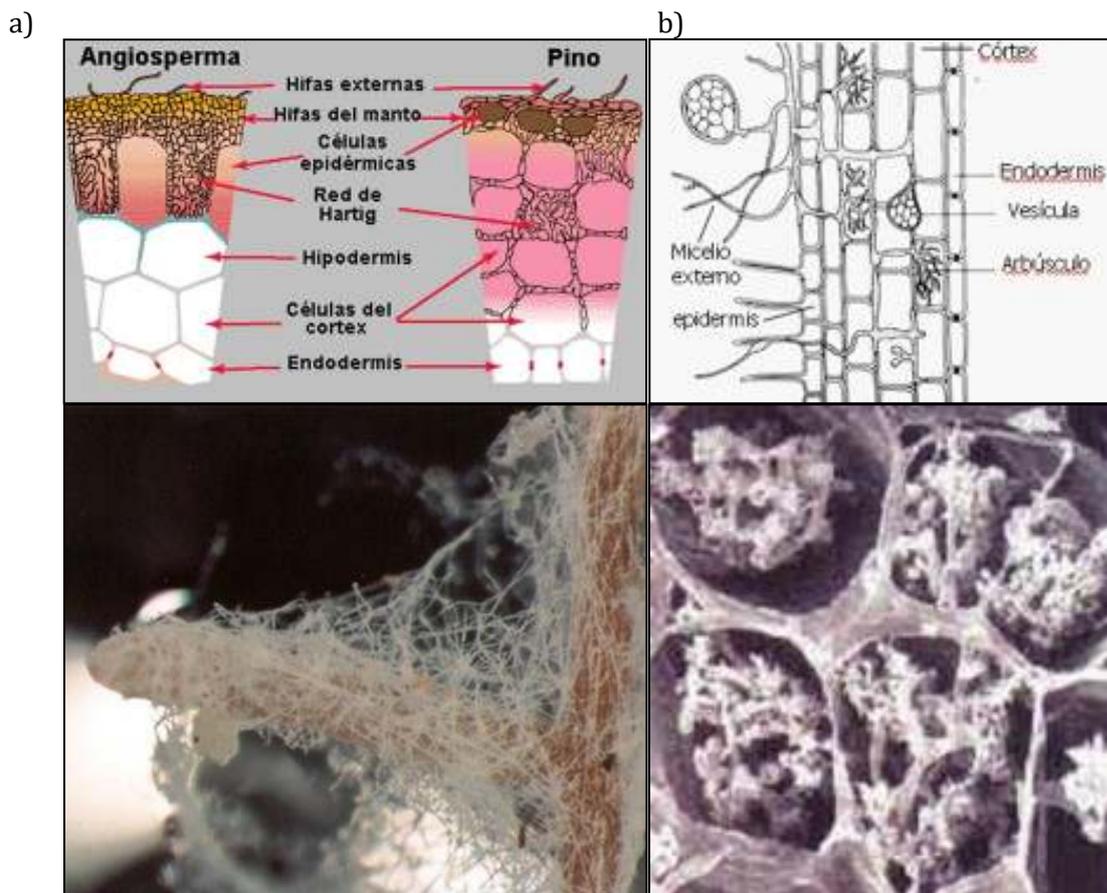


Fig 2. Esquema de desarrollo (superior) e imágenes (inferior) de a) ectomicorrizas (EcM) y b) endomicorrizas arbusculares (HMA) y vesiculares (HMV) fuente www.biologia.edu.ar 11/06/2017.

1.4. Objetivos

La rizosfera de la planta (zona de suelo alrededor de raíces vivas) se caracteriza por incrementar la actividad microbiana, que es estimulada por el exudado de sustancias orgánicas desde la raíz y, a su vez, la actividad de los microorganismos incide positivamente en el desarrollo de la planta, tal y como se ha indicado anteriormente. Sin embargo, el rol natural de los microorganismos de la rizosfera ha sido reducido o casi eliminado por labores de preparación de suelo y por el aumento en las aplicaciones de fertilizantes, herbicidas y pesticidas (Johanson et al., 2004)

El fortalecimiento de sistemas agrícolas sostenibles requiere del conocimiento fundamental de los diversos componentes que lo integran y que pueden ser determinantes en la funcionalidad de los mismos (Ferrera, 2001). Conocer la microbiología del suelo, es comprender que la materia orgánica y su microbiota juegan un papel preponderante en el proceso de fertilidad del suelo y, por ende, de su productividad bajo el marco de una agricultura sostenible. **El conocimiento de la actividad de los microorganismos del suelo** permite enfocar su manejo en aspectos nutricionales y sostenibles de los cultivos. Se puede eliminar el uso de fertilizantes químicos convencionales y fortalecer la microbiota del suelo mediante diferentes alternativas de manejo tales como el uso de sustratos orgánicos, la incorporación de abonos verdes y cultivos de cobertura o la incorporación (bioaumentación) de microorganismos beneficiosos (PGPMs) que ayudan a obtener producciones rentables y sostenibles.

El objetivo principal de este trabajo de investigación es determinar el efecto de la aplicación combinada de té de vermicompost y distintos PGPMs comerciales sobre la composición y funcionalidad de la microbiota rizosférica de un cultivo de melón tipo Galia (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus*) sobre sustrato orgánico. Para la consecución de dicho objetivo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la composición microbiana del té de vermicompost y las diferencias entre lotes de producción, así como la correspondiente a los PGPMs comerciales a incorporar en el cultivo del melón.
2. Analizar la composición y funcionalidad de la microbiota rizosférica del cultivo de melón sobre sustrato orgánico de vermicompost.
3. Establecer el impacto de la aplicación de té de vermicompost y PGPMs sobre la composición y funcionalidad de la microbiota rizosférica de cultivo de melón y seleccionar el tratamiento más idóneo de acuerdo con la calidad de la misma.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Sustrato de cultivo, Té de vermicompost y PGPMs

2.1.1. Sustrato empleado.

El sustrato empleado para el cultivo de melón estuvo constituido por una mezcla (en volumen) 40% Vermicompost (V) y 60% de fibra de coco (FC). El vermicompost utilizado procedía del vermicompostaje de restos vegetales (Tecomsa S.L.) (Fig. 3a). Para la

elaboración de la mezcla, en primer lugar se procedió al lavado de la fibra de coco para disminuir su contenido de sales. Para ello se depositan 15 kg de fibra de coco (bloque) en 200 L de agua y se dejó reposar durante 10 horas para facilitar el lavado. Posteriormente se drenó y se aireó durante 4 horas hasta alcanzar el 18% de humedad disponible (similar a vermicompost). Ambos componentes de la mezcla, fibra de coco (FC) y vermicompost (V), con el mismo porcentaje de humedad se mezclaron en proporción 40FC:60V (v/v) (Fig. 3b).

En la Tabla 2 se presenta la composición y principales características del sustrato en el momento de la siembra de melón. Este sustrato se preparó inicialmente para un cultivo de tomate y tras su ciclo de cultivo y retirada se empleó para el cultivo de melón que se presenta en este trabajo.

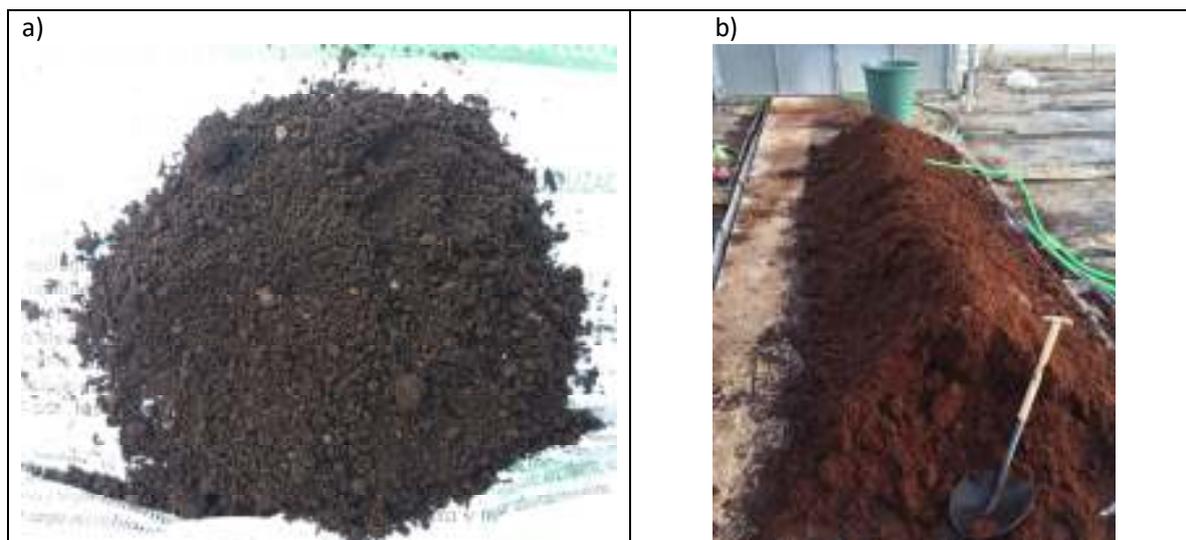


Fig. 3. a) Vermicompost y b) fase de preparación y mezcla del sustrato

Tabla 2. Características y composición del sustrato 40V/60FC

Parámetro (Unidades)	Valor
pH	7,81
Conductividad eléctrica 20 °C ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	4479
Sodio (mg L^{-1})	306
Potasio (mg L^{-1})	372
Calcio (mg L^{-1})	411
Magnesio (mg L^{-1})	164
Cloruro (mg L^{-1})	587
Nitrato (mg L^{-1})	253
Fosfato (mg L^{-1})	15
Sulfato (mg L^{-1})	1422
Bicarbonato (mg L^{-1})	345
Carbonato (mg L^{-1})	< 24
Relación de absorción de sodio	4,56
Nitrógeno Total (g por 100 g)	0,36
Carbono Total (g por 100 g)	7,43
Relación C : N	20,63

Al objeto de establecer la carga microbiana aportada por el sustrato, principalmente derivada del vermicompost de la mezcla, se analizaron Bacterias totales, Hongos totales y los grupos funcionales Fijadores de nitrógeno (FN), Solubilizadores de fosfatos (SF) y nitrificantes (NIT) de acuerdo con los protocolos descritos en el Apartado 2.3.

2.1.2. Preparación del té de vermicompost

En el proceso de elaboración del té se utilizaron 5 tanques con capacidad de 1000 L c/u, un Blower o soplador, tubos aireadores y una bomba de 5 hp (Fig. 4). Se empleó el vermicompost suministrado por la misma empresa (Tecomsa S.L.) para la preparación del sustrato de cultivo.



Fig. 4. Tanques de producción de té de vermicompost conectados al sistema de riego.

A continuación, se describe el proceso de preparación:

- a. Se llenó cada tanque de 1000 L con agua del sistema de riego, en forma programada ya que cada tanque suplía el consumo de té para 2 a 3 días.
- b. Se introdujo el vermicompost a razón de 1 kg por cada 10 litros de agua.
- c. Los tanques se airearon durante 4 días, a través de líneas de tubería de PVC perforadas, conectadas a compresor de aire (Blower 1.0 KW). Se realizó un control diario de Conductividad Eléctrica (CE), pH y de análisis de nutrientes al 4º día, antes de ser inyectado al sistema de riego.
- d. El líquido del tanque se filtró con malla de 120 mesh (0,125 mm), posteriormente se traspasó al tanque de inyección de solución nutritiva en el que se volvió a filtrar a través de malla 130 mesh (0,115 mm).

El té de vermicompost fue la base de la solución nutritiva en fertirriego tal y como se indica en el Apartado 2.2, de modo que se inyectaba un promedio de 80 mL de té vermicompost por litro de agua de riego. Las horas de riego se determinaron en base a la demanda de riego registrada y controlada por sensores dieléctricos según el contenido de humedad disponible (%) establecido (Apartado 2.2). En la Tabla 3 se presenta el análisis de nutrientes de té de vermicompost según el análisis efectuado al término de su preparación.

Tabla 3. Análisis de aniones y cationes en Té de vermicompost

Iones	Contenido (mmol L ⁻¹)*
NO ₃	17,7±2,05
NH ₄	0,5±0,05
Mg	1,1±0,08
K	4,9±0,84
Cl	9,0±0,22
Na	6,9±0,54
Ca	3,5±0,54

*media±desviación estándar

Cada 1 a 2 días se terminaba la fabricación de un tanque de té (1000 L), se traspasaba a tanque para aplicación en el sistema de riego y en el mismo momento se volvía a llenar de agua y se iniciaba de nuevo el proceso de fabricación de té.

Para establecer la carga y funcionalidades microbianas del té de vermicompost y las variaciones derivadas de los lotes de producción, se tomaron dos muestras de té, una correspondiente al té a aplicar en trasplante de melón (TV1, 15 marzo-17) y otra a los 52 días después de trasplante (TV2, 10 mayo-2017). En ambas muestras se analizaron: Bacterias totales, Hongos totales y los grupos funcionales Fijadores de nitrógeno (FN), Solubilizadores de fosfatos (SF), nitrificantes (NIT) y amonificantes (AM) de acuerdo con los protocolos descritos en el apartado 2.3.

2.1.3. PGPMs comerciales

Para los distintos tratamientos que se aplicaron a las plantas de melón se emplearon tres preparados comerciales de PGPMs: Bactel, que contenía mayoritariamente bacterias (PGPB); Tusal, que contenía hongos del género *Trichoderma* (TRICH); y Bioaris, con hongos micorrízicos arbusculares (HMA). A continuación, se indican las principales características de cada producto, de acuerdo con la información aportada por el fabricante.

- **Bacterias (PGPB)** (Bactel, Bioera S.L.): Según etiqueta de fabricante el producto contiene Rizobacterias 5×10^9 ufc/g de varios aislados de los géneros *Bacillus sp.* y *Paenibacillus sp.* y 1% de hongos micorrízicos (equivalentes a 10 esporas del género *Glomus sp.* por gramo de producto). El componente principal de este producto son las Rizobacterias, por ello en este trabajo se denominará como PGPB (por sus siglas en inglés, plant-growth-promoting-bacteria).
- **Hongos (TRICH)** (Tusal, Certis): El producto contiene dos especies de *Trichoderma*, *Trichoderma atroviride* (antes *T. harzianum*) 0,5% p:p, 1×10^8 ufc g⁻¹ y *Trichoderma asperellum* (antes *T. viride*) 0,5% p:p, 1×10^8 ufc g⁻¹.
- **Micorriza arbuscular (HMA)** (BIORADIS TABLET, Bioera S.L.): El producto contiene 5% (p/p) de hongos micorrízicos (equivalente a 150 esporas/g) pertenecientes a 5 especies del género *Glomus*: *Glomus intraradices*, *Glomus deserticola*, *Glomus clarum*,

Glomus mosseae y *Glomus agregatum*. Además, incluye rizobacterias de varios aislados de los géneros *Bacillus* sp. y *Paenibacillus* sp. El componente principal son las micorrizas arbusculares de género *Glomus* sp, por ello, en este trabajo se denominará como HMA (Hongos micorrízicos arbusculares). Este producto viene en forma de tabletas, cada tableta contiene 150 esporas de micorriza AM.

Al objeto de evaluar la carga y funcionalidad de la microbiota aportada por cada producto comercial se analizaron Bacterias totales, Hongos totales y los grupos funcionales Fijadores de nitrógeno (FN), Solubilizadores de fosfatos (SF) y nitrificantes (NIT) de acuerdo con los protocolos descritos en el Apartado 2.3.

2.2. Cultivo de melón y tratamientos

2.2.1. Localización y manejo agronómico del cultivo de melón

El experimento se realizó en un invernadero tipo multitunel con control de clima activo con ventanas cenitales y una superficie de 900 m² localizado en la Finca Experimental de la Fundación UAL-ANECOOP (36.861905,-2.282529), ubicada en el Paraje de los Goterones en Retamar, Almería.

El área de cultivo experimental fue 70 m² de melón tipo Galia (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus*), cultivar Brisa (HM Clause), con una planta por contenedor de 27 L de poliestireno con el sustrato previamente indicado y una densidad de plantación de 1,25 plantas m⁻² (Fig. 5).



Fig. 5. Cultivo de melón Galia (cv Brissa)

El melón se trasplantó el 16 de marzo de 2017, el cultivo fue rastrero, la polinización mediante el empleo de abejorros, y las labores culturales fueron mínimas (Tabla 4). La cosecha se realizó en un solo corte a los 90 días desde el trasplante.

El control de plagas se realizó según las normas de producción ecológica (Reglamento CE N° 834/2007). Durante el cultivo se realizaron 3 liberaciones de *Amblyseius swirskii*, *Amblyseius andersoni*, *Aphidius colemani* (Agrobio SL).

El cultivo se cubrió con manta térmica (espesor 17 g m⁻²) desde el trasplante hasta el inicio de la floración (cuatro semanas después del trasplante). Para el control de enfermedades se realizaron cuatro aplicaciones foliares preventivas con cobre (Scutum), azufre (Sulf 80 wg) y silicio (Hortosil).

Tabla 4. Labores culturales realizadas durante el cultivo.

Actividad	Fecha	Descripción	DDT*
Trasplante	15 marzo-17	Manual. Una planta por contenedor	0
Manta térmica	15 marzo-17	Sobre las plantas. Protección virus y bajas temperaturas	1
Poda de yemas apicales	15 abril-17	Guías o tallos primarios estimular floración y eliminar dominancia apical	30
Entrada de colmenas de abejorros	30 abril-17	Momento 1 flor femenina abierta por metro	45
Cosecha	20 mayo-17	Un solo corte	97

*DDT: Días desde el trasplante

2.2.2. Manejo de riego y nutrición.

El riego se efectuó mediante un sistema de riego por goteo con caudal de 4 Lh⁻¹ y suministro automatizado mediante la determinación de la humedad disponible en el sustrato, medida con sensor dieléctrico (Agrosistemas del Sur SL) instalado en cada contenedor sembrado. El sensor es una trisonda Decagon que además de la humedad disponible (%) permite medir la conductividad eléctrica (C.E.) y la temperatura del sustrato. El parámetro de decisión empleado para determinar el inicio de cada riego se estableció en un rango de 24-28% de contenido de humedad del sustrato. La medida de C.E. en el sustrato se consideraba para evitar, mediante el manejo de la frecuencia del riego, que superara valores de 4,5 dS m⁻¹. El pH en agua de riego se controló con sonda de pH y se ajustó mediante la inyección de vinagre de vino (ácido acético) para mantener pH a 5,5 – 6,5. El programa de nutrición se balanceó para cada fase de crecimiento, teniendo como fuente principal de nutrientes el **té de vermicompost** procedente de residuos vegetales hortícolas (Ingham, 2005; Gonzales, et al., 2013). Se realizó análisis de savia cada 15 días para controlar los rangos óptimos de nutrientes, solamente se reforzó con fuentes organominerales aprobadas de calcio y potasio (Atlántica Agrícola) cuando la concentración en savia de estos dos elementos era inferior al óptimo (Cadahía, 2008). El régimen de aplicación de té de vermicompost (terminado) fue permanente en todos los riegos recibidos por el cultivo, aplicándose el mismo té a todos los tratamientos mediante sistema de riego, al mismo tiempo la fabricación de té fue permanente durante todo el ciclo. El té terminado o elaborado era el que se aplicaba al cultivo a través del sistema de riego. La preparación del té y su composición nutricional se detallan en el apartado 2.2. Adicionalmente, con el agua de riego se incorporaron los PGPMs (Apartado 2.1.3) en los distintos tratamientos efectuados de acuerdo con las especificaciones indicadas en el Apartado 2.2.3.

2.2.3. Tratamientos y muestreos de rizosfera

Las plantas de melón fueron sometidas a cinco tratamientos diferentes dependiendo del PGPM incorporado:

T1 = Sin PGPMs

T2 = HMA

T3 = PGPB

T4 = TRICH

T5 = HMA + PGPB + TRICH (MIX)

Se realizaron 3 aplicaciones de los PGPMs de cada tratamiento junto con el agua de riego en tres fases del ciclo de cultivo: trasplante (0 DDT), floración (30 DDT) y crecimiento de fruto (60 DDT). La dosis por aplicación fue de 100 mL por planta de una solución de 50 g L⁻¹ de PGPB y de una solución de 100 g L⁻¹ del TRICH y 1 tableta de HMA por planta.

Cada tratamiento contaba con cuatro repeticiones compuestas por tres contenedores (plantas) cada una. En la Tabla 5 se presenta la distribución aleatoria de los tratamientos en la parcela de siembra.

Tabla 5. Distribución de tratamientos en la parcela.

T3	T2	T4	T5	T1	T2	T5	T2	T1	T2
T1	T2	T4	T3	T4	T5	T3	T1	T4	T1
T5	T4	T5	T1	T3	T2	T5	T4	T2	T1
T3	T2	T4	T5	T3	T4	T3	T2	T2	T5
T5	T1	T3	T2	T3	T5	T1	T4	T2	T1
T5	T4	T3	T4	T1	T5	T4	T3	T1	T3

Se tomaron muestras de suelo rizosférico de cada uno de los 5 tratamientos al inicio (Ti) del ciclo productivo (0 DDT) y una semana después (Tf) de la tercera aplicación de los tratamientos (crecimiento de fruta, 67 DDT). En cada muestreo se obtuvieron 12 sub muestras (1 por container) por cada tratamiento, éstas se mezclaron a partes iguales resultando una sola muestra compuesta (400 -450 g).

En estas muestras se analizaron Hongos Totales (HT) y Bacterias Totales (BT), asimismo, se evaluaron grupos funcionales como Fijadores de Nitrógeno (FN), Solubilizadores de Fosfato (SF) y Nitrificantes (NIT).

2.3. Medidas analíticas: Análisis microbianos

2.3.1. Muestras y preparación de muestras

De acuerdo con lo especificado previamente las muestras que se sometieron a análisis microbianos fueron: el té de vermicompost (TV) líquido, los productos comerciales empelados en los tratamientos, el sustrato de cultivo y el suelo rizosférico

Las muestras sólidas se diluyeron 1/10 (10⁻¹) añadiendo 10 g (peso húmedo) de muestra a 90 mL de solución salina estéril (NaCl 0,9%, p/v) en frasco ISO de 500 mL. Esta

suspensión se mantuvo en agitación magnética durante 30 min. A partir de esta primera dilución (10^{-1}) se obtuvieron diluciones decimales seriadas, hasta obtener la dilución adecuada de acuerdo con el tipo de microorganismo a evaluar (como máximo 10^{-6}), mediante la transferencia en condiciones asépticas de 1 mL a tubo conteniendo 9 mL de solución salina estéril. En el caso de las muestras líquidas (TV) no se realizó la primera suspensión, efectuando directamente las diluciones decimales seriadas. Las diluciones obtenidas se emplearon para sembrar los medios de cultivo que se especifican para cada grupo microbiano en los apartados siguientes.

Al objeto de expresar los resultados de cuantificación microbiana en peso seco, en las muestras sólidas se analizó la humedad mediante peso antes y después de desecar las muestras durante 24 h a 105 °C.

2.3.2. Bacterias y hongos totales

Para la cuantificación de bacterias totales (BT) y hongos totales (HT) se sembró 0,1 mL de diluciones adecuadas en placas de Petri con agar APHA (Panreac) y Rosa de Bengala (Panreac), respectivamente. Los medios se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante, y se repartieron en condiciones asépticas en placas Petri estériles de 9 cm de diámetro.

El volumen sembrado se extendió con bolitas de vidrio estériles y, tras eliminar las bolitas, las placas se incubaron a 30 °C durante 48 horas BT y 3-5 días HT. Transcurrido el tiempo de cultivo se contaron las colonias (Fig. 6) y los resultados se expresaron en UFC/g peso seco de muestra sólida o UFC/mL de líquido de acuerdo con la fórmula 1.

Fórmula 1

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{n^{\circ} colonias \times 10^n}{mL sembrados}$$

Donde:

- N° de colonias: Número de colonias contadas en la placa.
- 10^n : Inverso de la dilución sembrada.
- mL sembrados: volumen sembrado en placa (0,1mL).



Fig. 6. Placas para recuento de bacterias totales (izqda) y hongos totales (Dcha).

2.3.3. Solubilizadores de fosfatos

Para la cuantificación de solubilizadores de fosfatos se empleó el mismo procedimiento que para BT y HT, pero en este caso se empleó el medio para solubilizadores de fosfato con fosfato tricálcico (Pikovskaya, 1948) (Tabla 6). Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 3-6 días. Para la lectura se contaron sólo las colonias que aparecían con halo de aclaramiento (indicativo de solubilización del fosfato tricálcico) (Fig. 7).

Tabla 6. Medio solubilizadores de fosfato (Pykovskaya, 1948)*

Componente	Cantidad/L
Glucosa	10
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5
NaCl	0,2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1
KCl	0,2
Extracto de levadura	0,5
MnSO ₄ .H ₂ O	0,002
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,002
Agar	15

*Se incorporan los componentes del medio en agua destilada, se esterilizan a 121°C durante 20 minutos y posteriormente se repartió en placas de 9 cm agitando. El medio es turbio

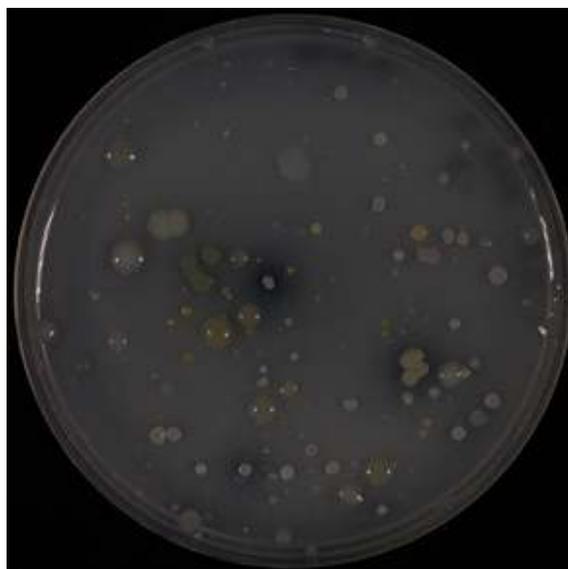


Fig. 7. Recuento de solubilizadores de fosfatos (SF)

2.3.4. Fijadores de nitrógeno

Los fijadores de nitrógeno también se cuantificaron empleando el procedimiento de recuento de colonias en placa. En este caso se empleó el medio agar Burk sin nitrógeno (Wilson y Knight, 1952) (Tabla 7), en el que sólo aquellos microorganismos capaces de desarrollarse lo harán por su capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico (N₂). Los medios sembrados se incubaron a 30 °C durante 3-6 días, tras lo cual se identificaron morfotipos coloniales diferentes y se contaron. Para verificar los fijadores de nitrógeno, se realizó una prueba confirmativa, de modo que cada morfotipo fue resembrado por aislamiento en nueva placa de Burk sin nitrógeno (BSN). Esta operación permitió determinar si los microorganismos que crecen son realmente fijadores o utilizan el nitrógeno fijado por otros microorganismos. Tras incubación de los aislamientos a 30 °C durante 24-48h, se procedió a la lectura confirmativa en la que se verificaron los morfotipos fijadores de nitrógeno (sólo son fijadores aquellos que en cultivo puro crecen en BSN) y el resultado final se expresó en UFC/g o mL.

Tabla 7. Medio de Burk sin nitrógeno (BSN) (Wilson y Knight, 1952)*

Componente	g/L
Glucosa	5
Sales A de Burk	100
Sales B de Burk	100
Sales C de Burk	100
Agar	20

Sales de Burk (g/L): Solución A (K₂HPO₄, 6,4 g, KH₂PO₄ 1,6 g), Solución B (NaCl 2,0 g, MgSO₄ 7·H₂O 2,0 g; CaSO₄ 2·H₂O 0,5 g), Solución C (Na₂MoO₄ 2·H₂O 0,01 g, FeSO₄ 7·H₂O 0,025 g). Se prepara cada solución por separado y se esterilizan (121°C, 20 min). Las sales se incorporan al resto de componentes del medio solubilizados en 700 mL de agua destilada una vez esterilizados (121°C, 20 min) de forma previa a ser repartido en placas.

2.3.5. Nitrificantes y amonificantes

Los microorganismos nitrificantes y amonificantes se cuantificaron mediante la técnica del número más probable (NMP). Para ello se sembró 1 mL de tres diluciones seleccionadas en tres tubos con 9 mL de medio para nitrificantes y amonificantes (Tabla 8), respectivamente. Los tubos sembrados fueron incubados a 30 °C durante 15 días. Posteriormente se procedió a la lectura mediante la incorporación de reactivos específicos para cada una de dichas actividades (Tabla 9a y b). Una vez detectado el número de tubos positivos para cada dilución se consultaron las tablas del NMP y los resultados se expresaron como NMP/g peso seco o mL, considerando las diluciones empleadas en la siembra. El valor tiene que multiplicarse por 10(n⁻¹) siendo “n” el número de la dilución menor utilizada en la siembra.

Tabla 8. Composición de los medios de cultivo para amonificantes y nitrificantes

Componente	Cantidad
Medio para amonificantes	
Solución de Winogradsky*	50 mL
Asparragina	0,2g
Solución de Oligoelementos**	1mL
Agua destilada	1L
Medio para nitrificantes	
Solución salina de Winogradsky*	50 mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5g
CaCO ₃	7,5g
Agua destilada	1L
*Solución de Oligoelementos	
Componente	g/L
Ácido nitrilotriacético 99%	1,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,0
NaCl	1,0
MnSO ₄ .H ₂ O	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1
CoSO ₄ .7H ₂ O	0,1
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1
ZnSO ₄ .H ₂ O	0,1
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01
AlK(SO ₄) ₂ .12H ₂ O	0,01
H ₃ BO ₃	0,01
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,01
**Solución de Winogradsky	
Componente	g/L
K ₂ HPO ₄	5
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,5
NaCl	2,5
Fe ₂ (SO ₄) ₃ .H ₂ O	0,05
MnSO ₄ .H ₂ O	0,05

Tabla 9a. Reactivo y lectura de Nitrificantes

Reactivo 1	Cantidad
Componente	g/L
Difenilamina	1
H ₂ SO ₄	100mL
Disolver la difenilamina en H ₂ SO ₄ y verter la mezcla sobre 20 ml de agua destilada.	
Reactivo 2	
H ₂ SO ₄ al 98%	150g
Lectura (Fig. 8a) :	
- Añadir 10 gotas del reactivo 1 y 2 al medio incubado.	
- Agitar y dejar en reposo 1 min.	
- Lectura positiva: Azul /Lectura negativa: Transparente(ausencia)	

Tabla 9b. Reactivo y lectura de Amonificantes

Reactivo 1	
Componente	g/L
HgI ₂	50
KI	36,5
Agua destilada c.s.p.	1 L
Reactivo 2	
Componente	g/L
KOH	150g
Agua destilada	c.s.p. 1L
Lectura (Fig. 8b):	
- Transferir 1 ml del medio incubado a un tubo de hemolisis.	
- Añadir una gota de cada reactivo, agitar y dejar en reposo 1 min.	
- Lectura positiva: Precipitado naranja/Negativa: Amarillo (ausencia)	



Fig. 8a. Lectura de nitrificantes

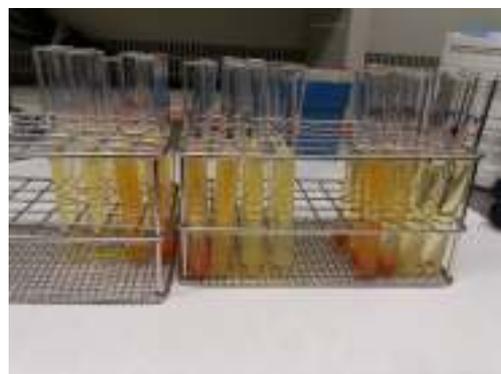


Fig. 8b. Lectura de amonificantes

2.4 Análisis estadístico

Los análisis de todas las muestras se realizaron por triplicado. Todos los resultados fueron inicialmente procesados mediante el programa Microsoft Office Excel 2010 para Windows. Se analizó el efecto de los factores evaluados (tiempo y tratamiento del cultivo de melón; lote de producción de vermicompost, o tipo de producto comercial) en la variabilidad del contenido de cada uno de los grupos microbianos analizados (recuentos UFC o NMP/g o mL) mediante un Análisis Factorial de Varianza (ANOVA) con interacción, en su caso; mientras que para la evaluación de la existencia de diferencias significativas para cada nivel de los factores indicados se utilizó el Test de Mínima Diferencia de Fisher (MDS), empleando un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$). Para estos análisis se utilizó el programa Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.17 (StatPoint, Inc., Virginia).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La producción de melón en invernadero con soluciones nutritivas orgánicas presenta una serie de ventajas entre las que sobresalen una productividad aceptable, reduce impacto ambiental negativo de fertilizantes químicos y mejora significativamente las cualidades nutraceuticas de la fruta, tal como capacidad antioxidante y contenido fenólico (Preciado-Rangel, et al., 2015). Se ha reportado en varios estudios realizados que los tratamientos de PGPMs y vermicompost pueden ser utilizados dentro de un marco de producción de agricultura sostenible enfocada en reducir los impactos negativos que está generando la aplicación de fertilizantes químicos (Joshi, et al., 2015), los resultados de este trabajo de investigación pretenden demostrar y comprobar la factibilidad de producir melón orgánico aplicando té de vermicompost y PGPMs como biofertilizantes.

3.1. Composición microbiana del té de vermicompost

En la Figura 9 se presenta la comparación entre la carga microbiana y grupos funcionales de dos lotes de producción de té de vermicompost empleados en los tratamientos aplicados al cultivo de melón (TV1 - 0 DDT y TV2 - 56 DDT). El té de vermicompost elaborado a partir de vermicompost de residuos vegetales presentó una elevada carga bacteriana (alrededor de 10^5 UFC mL⁻¹) y bastante más reducida de hongos (menor de 10^2 UFC mL⁻¹), sin diferencias significativas entre los dos lotes de producción.

En cuanto a los grupos funcionales, estuvieron presentes todos los grupos microbianos evaluados en las dos muestras. Los microorganismos solubilizadores de fosfatos, fijadores de nitrógeno y amonificantes estuvieron presentes en valores elevados, en torno a 10^5 UFC o NMP mL⁻¹, sin diferencias significativas entre los lotes. En cambio, los microorganismos nitrificantes, cuyos niveles fueron inferiores a los obtenidos en los otros grupos funcionales, alrededor de 10 NMP mL⁻¹, presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos lotes de producción, siendo un 57% inferior en TV2 en relación a

TV1. La posible causa de esta variación se investigará con más a profundidad en futuros estudios, sin embargo, puede suponerse su origen en base a las dos variantes principales que se presentaron entre ambas muestras, las cuales fueron diferente lote de fabricación de vermicompost y aumento de 10 °C en la temperatura promedio entre los dos tiempos de muestreo (15 marzo para TV1 y 10 mayo para TV2), tal como puede observarse en la Figura 10. En este sentido, los principales impedimentos en el uso de compost como agente de biocontrol o biofertilizante han sido las variaciones físico-químicas y biológicas entre los diferentes tipos, fuentes y lotes de producción (St Martin y Brathwaite, 2012); asimismo, el efecto de la temperatura, ratio vermicompost/agua y tiempo de extracción han sido reportados como los principales parámetros que influyen en las características químicas y la microbiota de los té de compost (Islam, et al., 2016).

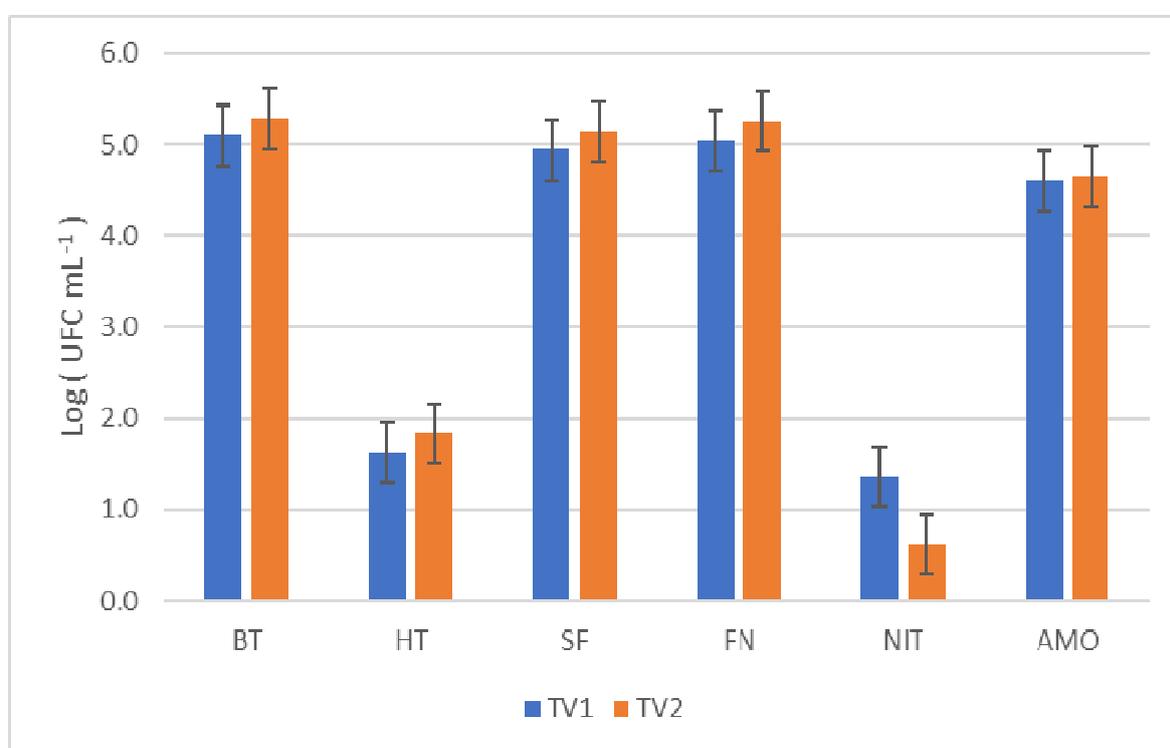


Fig. 9. Carga microbiana total (BT, bacterias totales; HT, hongos totales) y grupos funcionales (SF, solubilizadores de fosfatos; FN, fijadores de nitrógeno, NIT, nitrificantes y AMO, amonificantes) presentes en té de vermicompost de dos lotes de producción (TV1, 15 marzo; TV2, 10 mayo). Los resultados son la media de tres repeticiones (n=3), las barras de error muestran el intervalo LSD para un nivel de confianza del 95%.

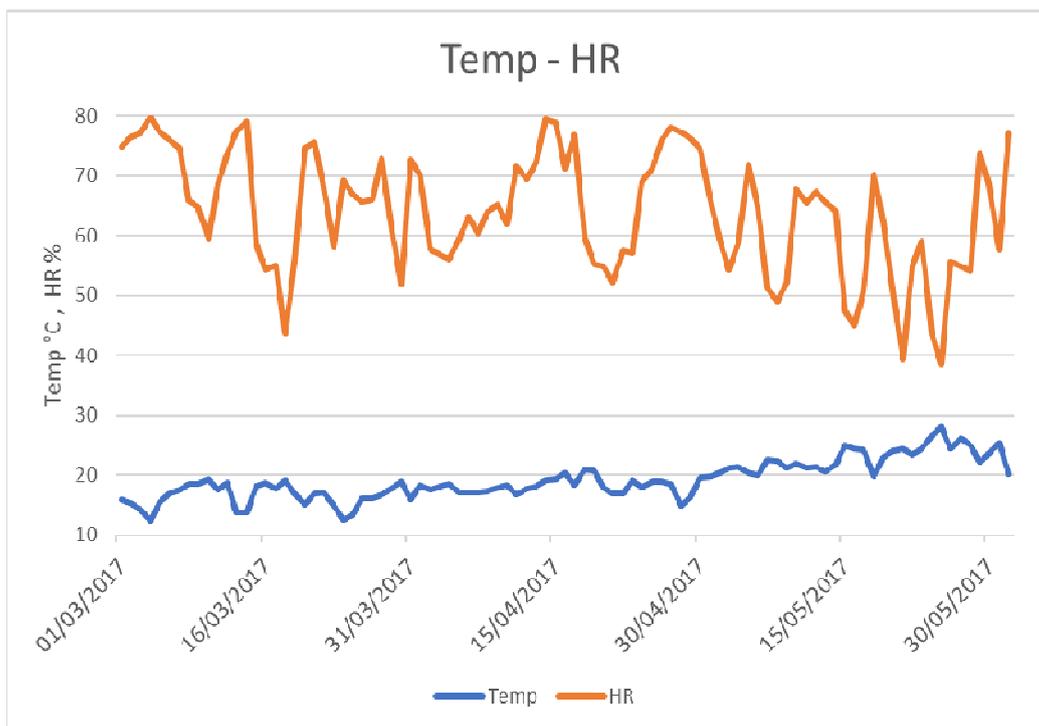


Fig. 10. Registro de temperatura (°C) y Humedad Relativa (%) durante cultivo de melón (nave U1)

Los microorganismos presentes en el té proceden del vermicompost empleado en su elaboración, que son aumentados y enriquecidos durante su elaboración. Es destacable la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos, cuya presencia en vermicompost y en el tracto intestinal de las lombrices de tierra ha sido descrita previamente (Joshi, et al., 2015; Hussain, et al., 2016). Concretamente, Hussain et al (2016) aislaron 5 cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno y 2 de bacterias solubilizadoras de fosfatos a partir del tracto intestinal de *Eisenia fétida* (Roja Californiana). Estos microorganismos son ideales para utilizar como biofertilizantes.

A pesar de las variaciones detectadas en los lotes de producción, los resultados obtenidos en cuanto a cantidad y tipo de microorganismos presentes en el té de vermicompost avalan el potencial efecto bioaumentador de la microbiota rizosférica, que debe ser considerado en programas de producción orgánica y ecológica dentro de un marco de agricultura sostenible para reducir parcialmente o eliminar el uso de fertilizantes químicos. Por tanto, el vermicompost es una fuente muy rica en nutrientes y en microorganismos según indican los resultados obtenidos en este estudio. Estos ayudan de forma directa o indirecta a la planta en su crecimiento, desarrollo y fortalecimiento de sistemas de defensa (Sarma, et al., 2010; Pane, et al., 2014; Kiyasudeen, et al., 2016). Estudios anteriores han demostrado que posee alto contenido en NKP, micronutrientes, microorganismos beneficiosos de suelo como bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos, hongos micorrizicos, humus y hormonas de crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas) (Sinha, et al., 2013).

3.2. PGPMs comerciales aplicados en cultivo

Para determinar el aporte al cultivo de melón de los microorganismos evaluados en este estudio por parte de los productos comerciales incorporados en los distintos tratamientos, se analizaron dichos grupos microbianos en los tres PGPMs (HMA, PGPB y TRICH). En la Figura 11 se presentan los resultados de dicho análisis. En ninguno de los productos se detectaron microorganismos nitrificantes. El producto de micorrizas **HMA** demostró ser el más completo en cuanto a variedad de microorganismos, ya que además de presentar una carga considerable de bacterias y hongos (BT, HT), incluyó niveles relativamente elevados de solubilizadores de fosfatos y fijadores de nitrógeno (SF, FN). El PGPM mayoritario en bacterias (**PGPB**), como cabría esperar, presentó una elevada carga bacteriana (10^9 UFC g^{-1} ps), la mayoría de las cuales eran bacterias fijadoras de nitrógeno (BT, FN), además contuvo también una cierta cantidad de hongos (10^4 UFC g^{-1} ps). No obstante, este producto no incluyó solubilizadores de fosfatos (SF). En **TRICH**, tal como se indica en su etiqueta comercial, los hongos fueron predominantes (mayor de 10^7 UFC g^{-1} ps), aunque también se detectaron bacterias en niveles en torno a 10^4 UFC g^{-1} ps. En este caso no se detectaron fijadores de nitrógeno ni solubilizadores de fosfato. Los tres PGPMs comerciales aplicados en el ensayo demostraron contener las actividades microbianas y grupos funcionales indicados para ser considerados PGPMs (Abhilash, et al., 2016).

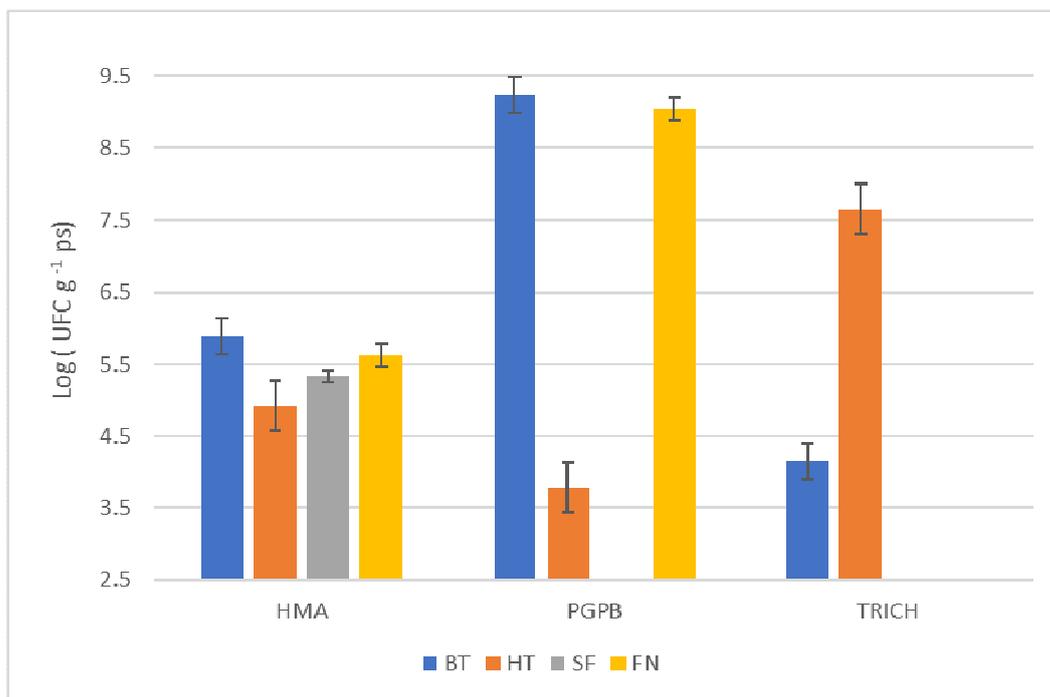


Fig. 11. Carga microbiana total (BT, bacterias totales; HT, hongos totales) y grupos funcionales (SF, solubilizadores de fosfatos; FN, fijadores de nitrógeno) presentes en en PGPMs comerciales utilizados. Los resultados son la media de tres repeticiones (n=3), las barras de error muestran el intervalo LSD para un nivel de confianza del 95%.

3.3. Efecto de tratamientos PGPMs y Té en microbiota rizosférica

Tal y como se especificó en Material y Métodos, las plantas de melón fueron sometidos a cinco tratamientos diferenciados por el PGPM incorporado (T1, Sin PGPMs; T2, HMA; T3, PGPB, T4, TRICH; T5, MIX) en 3 aplicaciones durante el ciclo productivo. Se analizó la carga microbiana del suelo rizosférico al inicio (Tiempo inicial) del ciclo productivo (0 DDT) y una semana después (Tiempo final) de la tercera aplicación de PGPMs (67 DDT). Para comparación se incluyeron en el análisis de resultados los datos obtenidos en el sustrato (SUS), vermicompost:fibra de coco, que se muestran como T0. A continuación se presentan los resultados de esta analítica para cada grupo microbiano.

En la Figura 12 se muestra la **carga bacteriana total (BT)** en la rizosfera para cada tratamiento a tiempo inicial y final. No se obtuvieron diferencias significativas para este parámetro a lo largo del tiempo. Los niveles de bacterias en suelos tratados (T1 a T5), regados con té de vermicompost, fueron significativamente superiores (10^7 - 10^8 UFC g^{-1}) que los obtenidos en el sustrato (T0) (10^6 UFC g^{-1}). Esto demuestra el enriquecimiento del suelo en bacterias provocado por el riego con té de vermicompost y probablemente motivado también por la influencia de la planta. En general no se observaron diferencias destacables entre los tratamientos con PGPMs, si bien es cierto que el sustrato que recibió té pero no PGPMs (T1) fue el único en el que se redujeron los niveles bacterianos con el tiempo. Esto puede estar relacionado con el aporte por parte de los PGPMs incorporados.

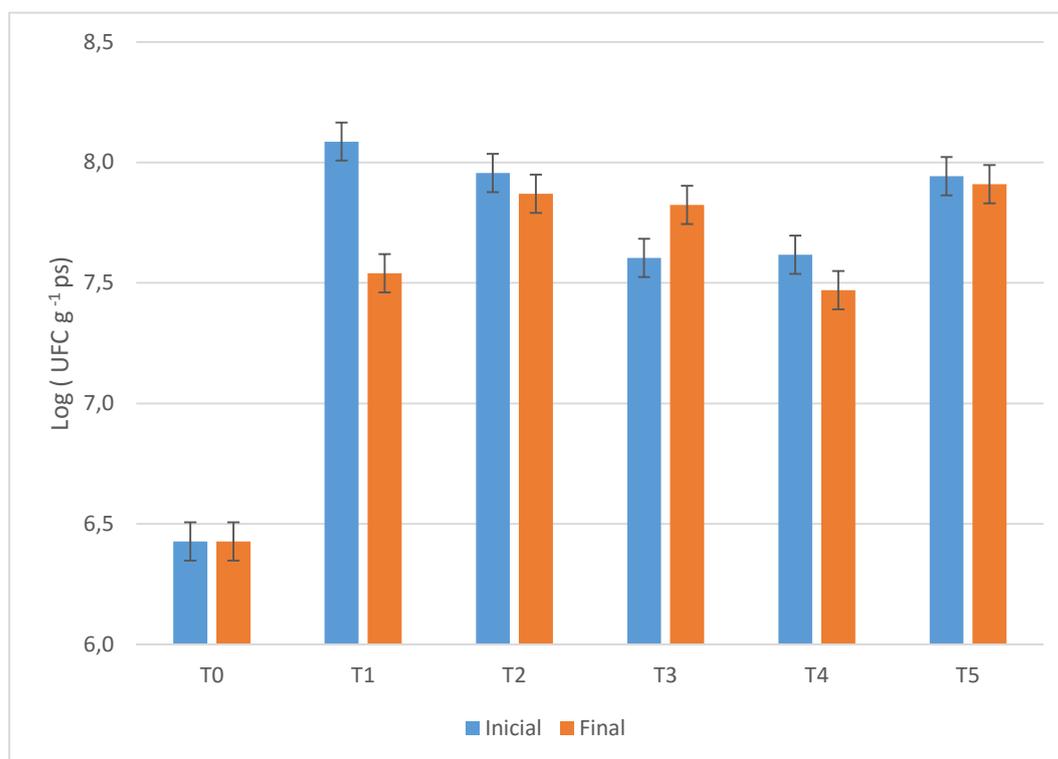


Fig. 12. Carga bacteriana total (BT) en suelo rizosférico de plantas de melón con distintos tratamientos al inicio y final de los mismos. T0, sustrato; T1, Sin PGPMs; T2, HMA; T3, PGPB, T4, TRICH; T5, MIX). Los resultados son la media de tres repeticiones y las barras de error representan la mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher ($P < 0,05$).

La Figura 13 muestra la carga **fúngica total (HT)**, que al igual que en el caso de bacterias, fue muy superior en suelos regados con té, con o sin PGPMs (T1 a T5), más de 10^5 UFC g^{-1} , que en el sustrato sin plantas (T0), en torno a 10^4 UFC g^{-1} . Todos los suelos rizosféricos sometidos a tratamiento con té tuvieron una carga fúngica similar. Los niveles de este grupo microbiano estuvieron influidos significativamente tanto por el tipo de tratamiento aplicado como por el tiempo. En todos los tratamientos excepto en el tratamiento T3 (PGPBs) la población fúngica se incrementó significativamente con el tiempo, alcanzando los máximos niveles, superiores a 10^6 UFC g^{-1} , en los suelos del tratamiento T2 (HMA) y T4 (TRICH). Esto último parece lógico ya que los dos productos aplicados incorporan hongos principalmente.

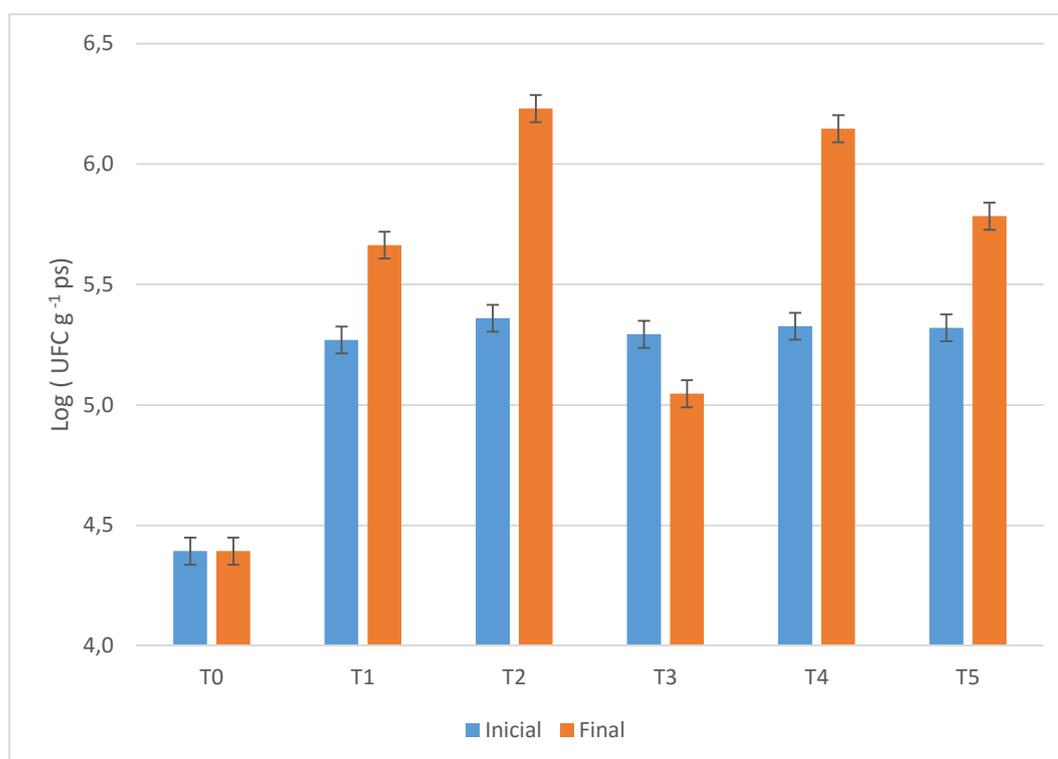


Fig. 13. Carga fúngica total (HT) en suelo rizosférico de plantas de melón con distintos tratamientos al inicio y final de los mismos. T0, sustrato; T1, Sin PGPMs; T2, HMA; T3, PGPB; T4, TRICH; T5, MIX). Los resultados son la media de tres repeticiones y las barras de error representan la mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher (P<0,05).

En la Figura 14 se muestra la concentración de solubilizadores de fosfatos (SF). Los niveles de este importante grupo microbiano estuvieron influidos significativamente por el tipo de tratamiento y el tiempo, así como por la interacción entre ambos factores. Al igual que los grupos microbianos globales, el número de solubilizadores de fosfato fue significativamente superior en sustratos regados con té (T1 a T5) que en el sustrato sin té ni planta (T0). No obstante, se obtuvieron unos niveles bastante elevados (10^6 UFC g^{-1}) en el

sustrato constituido por vermicompost (T0), lo que indica que éste aporta una carga de base de SF elevada, la cual se incrementa como consecuencia del riego con el té, cuyos niveles para este grupo microbiano fueron de 10^5 UFC g^{-1} (Fig. 9). En general, la incorporación de los PGPMs (T2 a T5) ocasionó un incremento significativo de los niveles de SF con el tiempo, siendo éste más acusado en el tratamiento T2 (HMA). Esto último parece lógico debido a que el producto incorpora hongos micorrízicos que presentan una reconocida capacidad como solubilizadores de fosfatos (Klironomos y Moutoglís, 2008; Williams et al., 2012; Cozzolino et al., 2013). Además, tal y como confirmaron los análisis iniciales efectuados a los PGPMs comerciales, dicho producto fue el único en el que se presentó una microbiota con dicha funcionalidad (Fig. 11). En los otros productos evaluados (PGPBs y TRICH) no se presentó tal tipo de microorganismos, sin embargo, su aplicación conjunta con el té parece estimular con el tiempo la microbiota solubilizadora de fosfatos. Actividad favorable para el desarrollo de las plantas (Williams et al., 2012; Cozzolino et al., 2013).

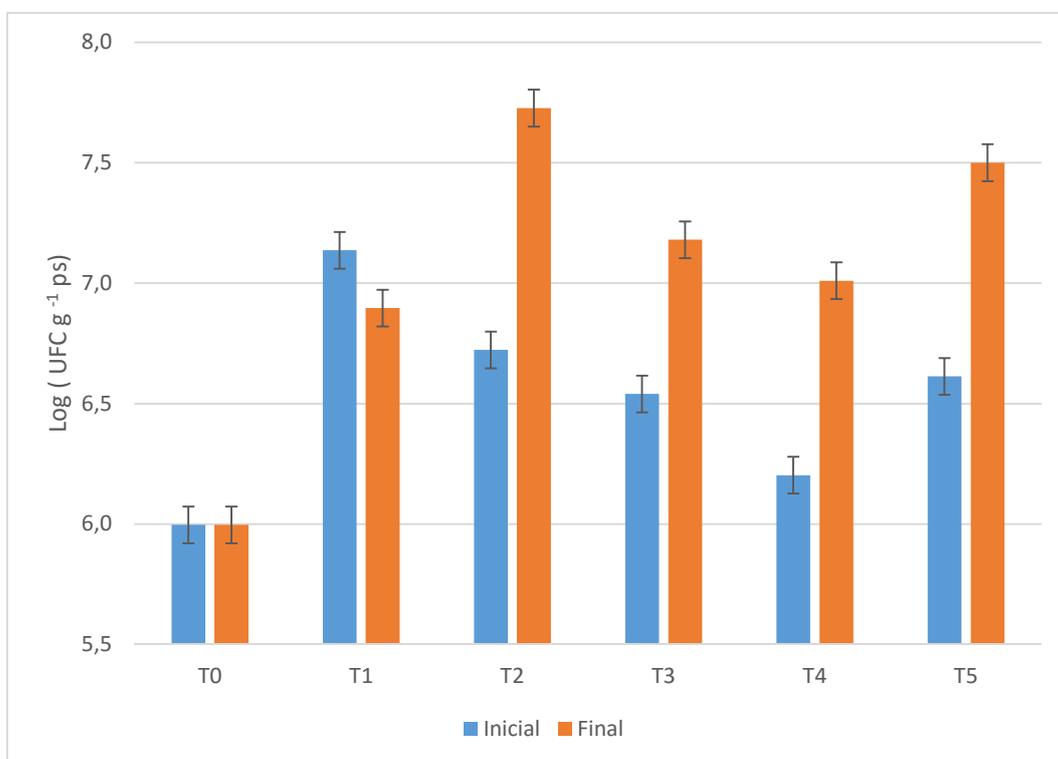


Fig. 14. Contenido en solubilizadores de fosfato (SF) en suelo rizosférico de plantas de melón con distintos tratamientos al inicio y final de los mismos. T0, sustrato; T1, Sin PGPMs; T2, HMA; T3, PGPB, T4, TRICH; T5, MIX). Los resultados son la media de tres repeticiones y las barras de error representan la mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher ($P < 0,05$).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, al igual que el resto de grupos evaluados alcanzaron unos niveles significativamente superiores en sustratos regados con té, independientemente del tratamiento aplicado (T1 a T5) (superior a 10^7 UFC g^{-1}) que en el

sustrato de vermicompost (T0) (alrededor de 10^6 UFC g^{-1}) (Fig. 15). Este efecto puede ser sinérgico, de forma que la bioaumentación FN aportada por el té, con niveles alrededor de 10^5 UFC g^{-1} , sumada a la presencia de la planta y a los nutrientes incorporados, podrían actuar de forma conjunta para incrementar la población de bacterias fijadoras de nitrógeno. En cuanto al efecto de los tratamientos y el tiempo, en este caso, al igual que para SF, ambos factores y su interacción influyeron significativamente en los niveles de FN obtenidos. El efecto fue diferente dependiendo del tratamiento aplicado, de modo que, los tratamientos con PGPMs (T2 a T5) en general, incrementaron significativamente la población de FN con el tiempo. Sin embargo cuando no fueron aportados (T1) no se observó tal efecto. Los tratamientos que condujeron a un mayor incremento en la población de bacterias fijadoras de nitrógeno fueron los que incorporaron bacterias PGPBs, es decir, los tratamientos T3 (PGPBs) y T5 (mezcla de PGPMs que incluye PGPBs). Esto está en consonancia con la elevada carga de FN detectada en el producto PGPBs (más de 10^8 UFC g^{-1}) (Fig. 11) que evidentemente contribuye a bioaumentar dicho grupo microbiano en la rizosfera.

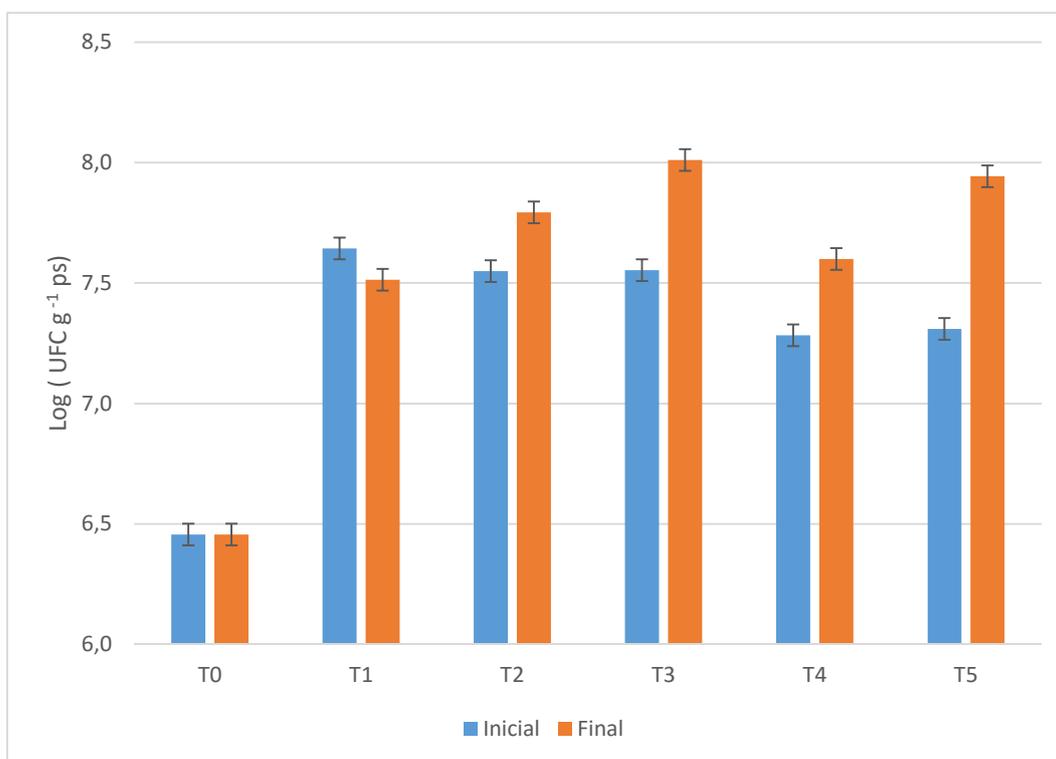


Fig. 15. Contenido en fijadores de nitrógeno (FN) en suelo rizosférico de plantas de melón con distintos tratamientos al inicio y final de los mismos. T0, sustrato; T1, Sin PGPMs; T2, HMA; T3, PGPB, T4, TRICH; T5, MIX). Los resultados son la media de tres repeticiones y las barras de error representan la mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher ($P < 0,05$).

Los microorganismos nitrificantes son bacterias quimiolitotrofas aerobias que oxidan el amonio (NH_4^+) a nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-) en dos etapas, primero el amonio es oxidado a nitrito por bacterias como *Nitrosomonas* o *Nitrosococcus*, y éste es oxidado

después a nitrato por bacterias como *Nitrobacter* o *Nitrococcus*. Dichas actividades están influenciadas por diversos factores ambientales (temperatura, pH y nutrientes). Temperaturas inferiores a 5 °C o la presencia de determinados compuestos orgánicos tóxicos inhiben el proceso (Ge et al., 2015). Los niveles de estos microorganismos en los experimentos realizados se muestran en la Figura 16. Los valores obtenidos para este grupo estuvieron influidos significativamente por el tratamiento y el tiempo, pero no por su interacción. El suelo rizosférico regado con té presentó unos niveles de nitrificantes muy superiores a los del sustrato (T0). En general, la población de nitrificantes se redujo con el tiempo en los suelos rizosféricos regados con té de vermicompost y con o sin tratamiento con PGPMs (T1 a T5). Este efecto tendría que evaluarse con detalle, pero probablemente esté relacionado con fenómenos de competencia con la microbiota incrementada por los tratamientos. Las bacterias nitrificantes tienen un crecimiento lento en comparación con organismos heterótrofos. Estos últimos estarían aumentados como consecuencia del sustrato empleado y los aportes de compuestos orgánicos proporcionados por el té. Adicionalmente, tal y como se comprobó en el análisis de productos comerciales, ninguno de ellos incorporó nitrificantes (Fig. 11) y fueron muy escasos en el té (Fig. 9).

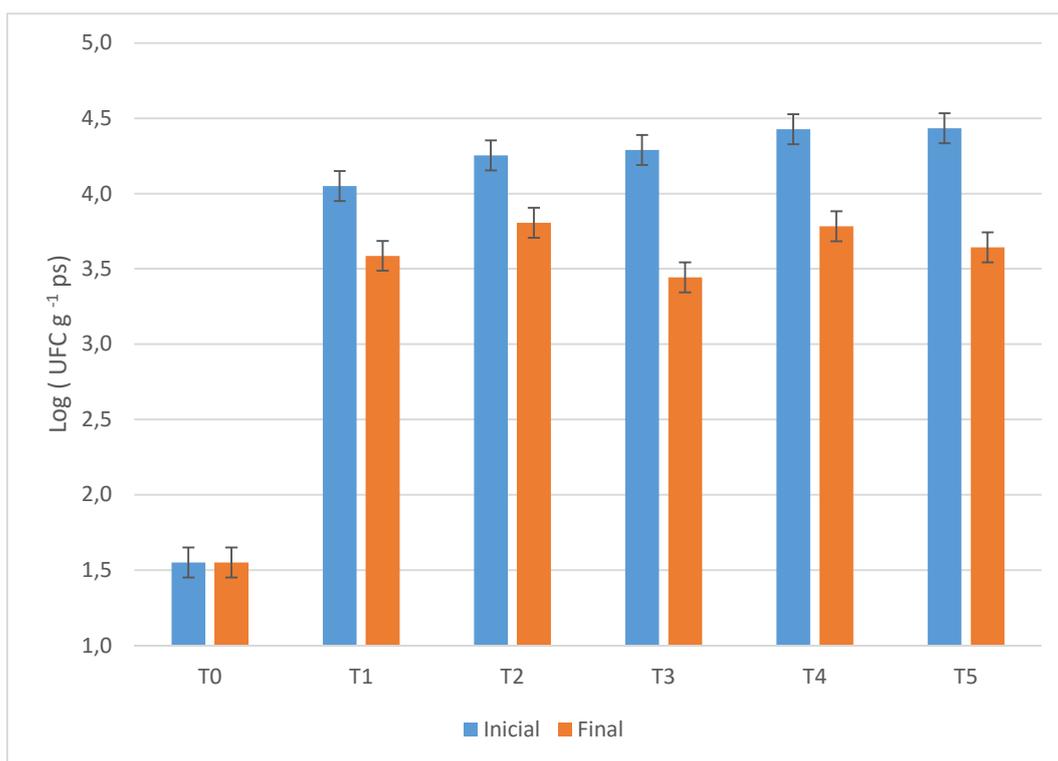


Fig. 16. Contenido en nitrificantes (NIT) en suelo rizosférico de plantas de melón con distintos tratamientos al inicio y final de los mismos. T0, sustrato; T1, Sin PGPMs; T2, HMA; T3, PGPB; T4, TRICH; T5, MIX). Los resultados son la media de tres repeticiones y las barras de error representan la mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher ($P < 0,05$).

De acuerdo con los resultados previamente expuestos y, a modo de resumen, los sustratos con melón que recibieron té de vermicompost y PGPMs (T2 a T5) presentaron una mayor cantidad de microorganismos totales (BT y HT) y específicos por grupos funcionales (FN, SF y NIT) que el sustrato sin planta ni té (T0). Los tratamientos T2 (HMA) y T5 (MIX) presentaron los mayores niveles de bacteria totales (10^8 UFC g⁻¹ ps); mientras que los tratamientos T2 (HMA) y T4 (TRICH) tuvieron los valores más elevados de hongos totales (10^6 UFC g⁻¹ ps). Respecto a los grupos funcionales, los solubilizadores de fosfatos alcanzaron los niveles máximos (10^7 UFC g⁻¹ ps) en sustratos sometidos al tratamiento T2; en el caso de las bacterias fijadoras de nitrógeno, el tratamiento más efectivo para incrementar sus niveles fue T3 (PGPB) con 10^8 UFC g⁻¹ ps, seguido por los tratamientos T5 (MIX) y T2 (HMA) con 10^7 UFC g⁻¹ ps.

Los microorganismos promotores de crecimiento de plantas (PGPM) han sido muy estudiados y se ha reportado todos los beneficios que estos representan para ser considerados dentro de programas de biofertilización dentro de procesos de agricultura sostenible, las complejas interacciones que existen entre suelo – planta- microorganismos conducen a asociaciones en la rizosfera muy útiles para la fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo y potasio, jugando un papel muy importante en la fertilidad del suelo (Yadav, et al., 2015; Kumar, 2016). La bioaumentación y bioestimulación mediante el aporte de sustratos orgánicos, manipulación y aseguramiento de la calidad en procesos de fabricación de té, nuevas técnicas para caracterización de materia orgánica y desarrollo de perfiles microbianos de comunidades (St Martin y Brathwaite, 2012) puede acelerar la aplicación de técnicas más amigables con el medio ambiente. En este estudio se ha comprobado la riqueza microbiana rizosférica y grupos funcionales (SF, FN, NIT, AMO) presentes en tratamientos de té de vermicompost asociado a PGPMs.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permitieron extraer las siguientes conclusiones:

1. El té de vermicompost contiene una elevada población de bacterias e incluye también una elevada proporción de grupos microbianos con interesantes actividades biofertilizantes tales como solubilizadores de fosfato y fijadores de nitrógeno. Además, esta población microbiana prácticamente no varía entre lotes de producción diferentes.
2. El empleo de té de vermicompost como solución nutritiva en el agua de riego de cultivo de melón sobre sustrato orgánico (vermicompost:fibra de coco) ocasiona un incremento de la población microbiana total (bacterias y hongos), así como de microorganismos solubilizadores de fosfato, fijadores de nitrógeno y nitrificantes.

3. La carga bacteriana total en el sustrato rizosférico de cultivo orgánico de melón regado con té de vermicompost no se ve afectada por la incorporación de PGPMs comerciales, aunque sí varían los niveles de hongos totales y los grupos funcionales microbianos dependiendo de los tratamientos aplicados.
4. La incorporación conjunta de té de vermicompost y PGPMs comercial con contenido mayoritario en bacterias (PGPBs) (Tratamiento 3) produce un incremento de la población de bacterias fijadoras de nitrógeno en el sustrato rizosférico de cultivo orgánico de melón.
5. La incorporación conjunta de té de vermicompost y PGPMs comercial con micorrizas (HMA) (Tratamiento 2) produce un incremento de la población de microorganismos solubilizadores de fosfatos en el sustrato rizosférico de cultivo orgánico de melón.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, doy gracias a Dios que me permitió cumplir los objetivos y alcanzar las metas propuestas. Un agradecimiento muy especial a mis tutores Dr. Joaquín Moreno Casco y la Dra. María Jose López por todos los conocimientos, consejos y apoyo brindado para desarrollar esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Abhilash, P.C., Dubey, R.K., Tripathi, V., Gupta, V.K., Singh, H.B. (2016) Plant growth-promoting microorganisms for environmental sustainability. *Trends Biotechnology* 34:11, 847-850.
- Acea, M.J., Prieto-Fernandez, A. and Diz-Cid, N. (2003) Cyanobacterial inoculation of heated soils: effect on microorganisms of C and N cycles and on chemical composition in soil surface. *Soil Biology & Biochemistry* 35: 513-524.
- Agbodjato, N.A., Noumavo, P.A., Adjanohoun, A., Dagbenonbakin, G., Atta, M., Falcon Rodriguez, A., Pons, B.M.D., Baba-Moussa, L. (2015) Response of maize (*Zea mays* L.) Crop to biofertilization with plant growth promoting rhizobacteria and chitosan under field conditions. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* 3: 566-574.
- Anilkumar, A.S., Harikrishnan, N.K., Sherief, A.K. (2007) Utilization of enriched coirpith-vermicompost in organic mediculture. *Plant Archives* 7:617-620.
- Antonn, H., Prevost, D. (2005) Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. En: Siddigui Z.A. (Ed), PGPR: Biocontrol and biofertilization. *Springer, Netherlands*.
- Arancon, N. Q., Edwards, C. A., Dick, R., Dick, L. (2007). Vermicompost tea production and plant growth impacts. *Biocycle* 48: 51.
- Atiyeh, R.M., Edwards, C.A., Subler, S. et al (2001) Pig manure vermicompost as a component of a horticultural bedding plant medium: effects on physicochemical properties and plant growth. *Bioresource Technology* 78(1): 11-20.

- Barrow, J.R., Osuna, P. (2002) Phosphorus solubilization and uptake by dark septate fungi in fourwing saltbush, *Atriplex canescens* (Pursh) *Nutr. J. Arid Environment* 51: 449-459.
- Benitez, T., Rincon, A.M., Limon, M.C., Codon, A.C. (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249-260.
- Berruti, A., Lumini, E., Balestrini, R., Bianciotto, V. (2016) Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Natural Biofertilizers: Let's Benefit from Past Successes. *Frontiers in Microbiology* 6.
- Burnett, S.E., Mattson, N.S., Williams, K.A. (2016) Substrates and fertilizers for organic container production of herbs, vegetables, and herbaceous ornamental plants grown in greenhouses in the United States. *Science Horticulturae* 208: 111-119.
- Cadahía, C. (2008) La savia como índice de fertilización, cultivos agroenergeticos. Horticolas, frutales y ornamentals. Madrid: Mundi-Prensa.
- Cano, M.A. (2011) Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma spp.* y *Pseudomonas spp.* U.D.C.A. *Actualidad & Divulgación Científica*. 14(2): 15-31.
- Cozzolino, V., Di Meo, V., Piccolo, A. (2013). Impact of arbuscular mycorrhizal fungi applications on maize production and soil phosphorus availability. *Journal of Geochemical Exploration* 129: 40-44
- Ferrera, R., Alarcón, A. (2001) La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sum* 8:2 UNAM.
- Ge, S., Wang, S., Yang, X., Qiu, S., Li, B., Peng, Y. (2015). Detection of nitrifiers and evaluation of partial nitrification for wastewater treatment: a review. *Chemosphere* 140: 85-98.
- Gonzalez Solano, K.D., Rodriguez Mendoza, M.d.l.N., Trejo Tellez, L.I., Garcia Cue, J.L., Sanchez Escudero, J. (2013) Vermicompost effluent and tea in the production of leafy vegetables in system J. nft. *Interciencia* 38: 863-869.
- Gray, E.J., Smith, D.L. (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 395-412.
- Gupta, V., Satyamarayana, T., Garg, S. (2000) General aspects of mycorrhiza. En: Mukerji, K.G., Singh, J., Chamola, B.P. (Eds), *Mycorrhizal Biology*. Kluwer Academic /Plenum, New York, pp. 27-44.
- Hussain, N., Singh, A., Saha, S., Venkata, M., Bhattacharyya, P., Bhattacharya, S.S. (2016) Excellent N-fixing and P-solubilizing traits in earthworm gut-isolated bacteria: A vermicompost based assessment with vegetable market waste and rice straw feed mixtures. *Bioresource Technology* 222: 165-174.
- Ingham, E.R. (1999) What is compost tea? Part I. *BioCycle* 40: 74-5.
- Ingham, E.R. (2005) *The compost tea brewing manual*, fifth edition. Oregon: Soil Food Incorporated.
- Islam, M.K., Yaseen, T., Traversa, A. et al (2016) Effects of the main extraction parameters on chemical and microbial characteristics of compost tea. *Waste Management* 52, 62-68.
- Johansson, J.F., Paul, L.R., Finlay, R.D. (2004). Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology* 48: 1-13.
- Joshi, R., Singh, J., Adarsh, P.V. (2015) Vermicompost as an effective organic fertilizer and biocontrol agent: effect on growth, yield and quality of plants. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 14: 137-159.
- Kiyasudeen, K. (2016) Prospects of organic waste management and the significance of Earthworms, *Applied Environmental Science and Engineering for a Sustainable Future*. Springer pp 201-231.

- Klironomos, J., Hart, M., Moutoglis, P. (2008) The effect of inoculation with the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices* on transplant survival of perennial herbaceous plants. University of Guelph, Biological Sciences Dept. Ontario, Canada.
- Kowalska, J., Remlein-Starosta, J., Seider-Lozykowska, K. et al (2014) Can *Trichoderma asperellum*(T1) stimulate growth of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) in different systems of cultivation. *Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus* 13(1): 91-102.
- Kumar, V.V. (2016) Plant Growth-Promoting Microorganisms: Interaction with plants and soil. En: *Plant, Soil and Microbes*. pp 1-16. Springer International Pub.
- López, J.C., Perez, C. and Fernandez, M.D. (2014a) Characterization of greenhouse crop residues in Almeria. *7th Iberian Congress of Agricultural Engineering and Horticultural Sciences*. Madrid, Spain.
- López, G., Almonte, I., Aridio, P., Sotomayor-Ramirez, D., Nuñez, P.A. (2014b) Caracterización biológica de suelos y sustratos empleados en la producción de vegetales en invernaderos. *Ciencia del Suelo* 32:1, 29-39.
- Manh, Vo, Wang, H. (2014) Vermicompost as an important component in substrates: effects on seedling quality and growth of muskmelon (*Cucumis melo* L.). *4th International Conference on Agriculture and Animal Science (CAAS 2013)*. Elsevier BV.
- Martinez R. E. et al. (2013) *Manual teorico practico Los Biofertilizantes y su uso en agricultura*, SAGARPA-COFUPRO-UNAM, Mexico: Editorial Prado S.A.
- Mendoza-Hernandez, D., Fornes, F., Belda, R. (2014) Compost and vermicompost of horticultural waste as substrates for cutting rooting and growth of Rosemary. *Scientia Horticulturae*, 178: 192-202.
- Organizacion de las Naciones Unidas para la Alimentacion y la Agricultura-FAO (2012) El cambio climatico, la agricultura y la seguridad alimentaria. www.fao.org
- Organizacion de las Naciones Unidas para la Alimentacion y la Agricultura-FAO (2016) El estado mundial de la agricultura y la alimentacion. Cambio climatico, agricultura y seguridad alimentaria. www.fao.org
- Owen, D., Williams, A.P., Griffith, G.W., Withers, P.J.A. (2015) Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. *Applied Soil Ecology* 86: 41-54.
- Pane, C., Palese, A.M., Celano, G. and Zaccardelli, M. (2014) Effect of compost tea treatments on productivity of lettuce and kohlrabi systems under organic cropping management. *Italian Journal of Agronomy* 9:596.
- Pascale, A., Vinale, F., Manganiello, G. et al (2017) Trichoderma and its secondary metabolites improve yield and quality of grapes. *Crop Protection* 92: 176-181.
- Pikovskaya, R.I. (1948) Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17: 362-370.
- Preciado-Rangel, P., García-Villela, K., Fortis-Hernández, M., Valencia, R.T., Rueda, E.O., Esparza-Rivera, J.R. (2015) Nutraceutical quality of cantaloupe melon fruits produced under fertilization with organic nutrient solutions. *Ciencia e Investigación Agraria* 42: 475-481.
- Rawat, R., Tewari, L. (2011) Effect of abiotic stress on phosphate solubilization by biocontrol fungus *Trichoderma* spp. *Current Microbiology* 62: 1521-1526.
- Rodriguez, R.J., White Jr, J.F., Arnold, A.E., Redman, R.S. (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*. 182: 314-330.
- Sarma, B.K., Singh, P., Pandey, S.K., Singh, H.B. (2010) Vermicompost as modulator of plant growth and diseases suppression. *Dynamic Soil, Dynamic Plant*, Global Science Books.
- Scheuerell, S., Mahaffee, W. (2002). Compost tea: principles and prospects for plant disease control. *Compost Science & Utilization* 10: 313-338.

- Shu-Ying, L., Chuan-Kai, L., Chaur-Tsuen, L. et al (2016) Chrysophanol is involved in the biofertilization and biocontrol activities of *Trichoderma*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 96: 1-7.
- Sinha, R. K., Herat, S., Bharambe, G., Brahambhatt, A. (2010) Vermistabilization of sewage sludge (biosolids) by earthworms: converting a potential biohazard destined for landfill disposal into a pathogen-free, nutritive and safe biofertilizer for farms. *Waste Management & Research* 28: 872-881.
- Sinha, R.K., Soni, B.K., Agarwal, S., Shankar, B., Hahn, G. (2013) Vermiculture for organic horticulture: Producing chemical-free, nutritive & health protective foods by earthworms. *Agricultural Science* 1: 17-44.
- Song, X., Liu, M., WU, d., Griffiths, B., Jiao, J., Li, H., Hu, F. (2015) Interaction matters: Synergy between vermicompost and PGPR agents improves soil quality, crop quality and crop yield in the field. *Applied Soil Ecology* 89: 25-34
- St Martin, C.C., Brathwaite, R.A. (2012) Compost and compost tea: principles and prospects as substrates and soil-borne disease management strategies in soil-less vegetable production. *Biological Agriculture & Horticulture* 28: 1-33.
- Williams, A., Ridgway, H., Norton, D. (2012) Different arbuscular mycorrhizae and competition with an exotic grass affect the growth of *Podocarpus cunninghamii* Colenso cuttings. *New Forests* 44: 183-195.
- Wilson, P.W., Knight, S.C., 1952. Experiments in Bacterial Physiology. Burgess, Minneapolis, USA, p. 49.
- Yadav, B.K., Akhtar, M.S., Panwar, J. (2015) Rhizospheric plant microbe interactions: a key factor to soil fertility and plant nutrition. En: Arora NK (ed) Plant microbe symbiosis—applied facets. *Springer*, New Delhi, pp 127–145.
- Zulkarami, B., Ashrafuzzman, M., Razi, I.M. (2010) Morpho-physiological growth, yield and fruit quality of rock melon as affected by growing media and electrical conductivity. *Journal of food Agriculture & Environment* 8: 249-25.