

CARACTERIZACIÓN DE HONGOS
Y
BACTERIAS COLIFORMES
PRESENTES EN EL BIOSÓLIDO MUNICIPAL COMPOSTADO

Por
Grisselle E. Pérez Sánchez

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS
en
Horticultura

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
MAYAGÜEZ, PUERTO RICO
2012

Aprobado por:

Lydia I. Rivera Vargas, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Myrna Z. Alameda Lozada, M.S.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

María del Carmen Librán Salas, Ph.D.
Presidenta, Comité Graduado

Fecha

Jorge A. González Soto, Ph.D.
Representante de Escuela Graduada

Fecha

Skip Van Bloem Ph.D.
Director del Departamento

Fecha

ABSTRACT

Municipal Sewage Sludge Compost (MSSC) is used as an alternate growing media for peat. However the use of MSSC can be affected by the pre sense of pathogenic microorganisms. Concerns about the effects of pathogens motivates additional study of MSSC. The principal objective was to characterize fungi and detect coliform bacteria such as *E. coli* and *Salmonella* spp. in the MSSC and peat. The fungi identified in the MSSC were from the following genera: *Aspergillus*, *Conidiobolus*, *Curvularia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis* and *Trichoderma*. *Aspergillus fumigatus* was identified in the peat. This species has been reported to be a human pathogen. For the detection of coliforms the methods used were: membrane filtration and Colilert test. The total coliforms were detected in all treatments of MSSC, meanwhile in the peat were not detected. *Salmonella* spp. was not detected in either substrate. The coliforms identified in the MSSC were *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Aeromonas encheleia*, *Escherichia fergusonii*, *Pasteurella bettyae*, *Pantoea stewartii ss stewartii*, *Rahnella aquatilis* and *Vibrio tubiashii*. All of these have been reported as opportunistic pathogens. Lettuce plants were grown in both substrates and coliforms were detected in plant tissue. *Enterobacter sakazakii* was detected in lettuce grown in MSSC, *Pantoea dispersa* in lettuce grown in peat, and *Pantoea dispersa* and *Pseudomonas mendocina* in a mix of MSSC and peat. The presence of these coliform bacteria in the substratum represents a risk to the health of human, who handle this growing media. Furthermore, the capacity of transport of the coliforms into the plant tissue indicates that growing media is one of restricted use. Based on results of this research, I cannot recommend the use of MSSC for food crops.

RESUMEN

El Biosólido Municipal Compostado (BMC) es utilizado como medio de cultivo alternativo a la turba. Sin embargo, su uso puede verse afectado por la presencia de microorganismos patógenos. Por tal razón, nos motivó realizar estudios adicionales al BMC. El objetivo principal fue caracterizar hongos y detectar la presencia de bacterias coliformes, *E. coli* y *Salmonella* spp. en el BMC y la turba. Los hongos identificados en el BMC pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Conidiobolus*, *Curvularia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis* y *Trichoderma*. Se identificó a *Aspergillus fumigatus* en muestras de turba. Esta especie se ha reportado como patógeno humano. Para la detección de coliformes se utilizó el método de filtración por membrana y la prueba Colilert. Los coliformes, fueron detectados en todos los tratamientos de BMC mientras que en la turba no fueron detectados. *Salmonella* spp. no fue detectada en ninguno de los sustratos. Las bacterias identificadas en los tratamientos de BMC fueron, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Aeromonas encheleia*, *Escherichia fergusonii*, *Pasteurella bettyae*, *Pantoea stewartii* ss *stewartii*, *Rahnella aquatilis* y *Vibrio tubiashii*, todas han sido reportadas como patógenos oportunistas. Plantas de lechuga fueron crecidas en estos sustratos detectándose la presencia de coliformes en el interior del tejido de la planta. *Enterobacter sakazakii* fue detectada en las lechugas crecidas en BMC. Se detectó *Pantoea dispersa* en lechugas crecidas en la turba y *Pantoea dispersa* y *Pseudomonas mendocina* en las crecidas en mezcla de BMC y turba. La presencia de estas bacterias coliformes en el sustrato es un riesgo a la salud de quienes manejan este medio de cultivo. El BMC debe ser un sustrato de uso restringido debido a la capacidad de transporte y colonización de los coliformes en los tejidos de las planta. Basados en los resultados de esta investigación no recomiendo el uso del BMC para el cultivo de productos alimenticios.

© Grisselle E. Pérez Sánchez, 2012.

DEDICATORIA

A mi familia quienes con su amor y admiración han sido mi mayor motivación para el éxito y culminación de este estudio de tesis. En especial a mi hermana Yolanda para quien quiero servir de ejemplo, estimulando en ella la inquietud de investigación científica que me ha impulsado siempre en mis estudios. A mi esposo, Israel por su apoyo y compañía durante mis años de estudio. A mi hijo, Irasel quien desde aun sin nacer, ha compartido conmigo el proceso de redacción de este escrito.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los miembros de mi comité, Dra. María del Carmen Librán, Dra. Lydia Rivera y la Profesora Myrna Alameda por ser mis guías en esta meta profesional. Dedicarme su tiempo y compartir sus conocimientos moldeando así mi ser profesional. Al personal del departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales por ayudarme durante los años de estudio. En especial a la Agro. Lilliam Cardona quien me enseñó inicialmente las técnicas de laboratorio utilizadas en este estudio. Al Dr. Feiko Ferweida por permitirme utilizar las facilidades de su laboratorio. Del Departamento de Biología a la Dra. Sandra Maldonado por facilitarme las claves taxonómicas para la identificación de hongos. A mi hermana Yolanda por ser mi ayudante de laboratorio en muchas ocasiones.

TABLA DE CONTENIDO

	PÁGINAS
ABSTRACT	ii
RESUMEN	iii
AGRADECIMIENTO	vi
TABLA DE CONTENIDO	vii
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Revisión de literatura	2
1.1.1 Medios de Cultivo	2
1.1.1.1 BMC	2
1.1.1.2 Turba	4
1.1.2 Microorganismos en el BMC	5
1.1.2.1 Hongos	5
1.1.2.2 Bacterias	6
1.1.2.2.1 Coliformes	6
1.1.3 Acción Microbiana	7
1.1.3.1 Antagonistas	8
1.1.3.2 Efectos de Solubilización de los Microorganismos en el BMC	9
1.2 Literatura citada	11
2. CARACTERIZACIÓN DE HONGOS PRESENTES EN EL BIOSÓLIDO MUNICIPAL COMPOSTADO Y LA TURBA	
2.1 Resumen	14
2.2 Introducción	15
2.3 Materiales y Métodos	17
2.3.1 Caracterización de hongos en el BMC y la turba	17
2.4 Resultados y Discusión	18
2.4.1 Caracterización de hongos en el BMC y la turba	18
2.4.1.1 Crecimiento de hongos en agar OHIO	18
2.4.2. Hongos en el BMC	22

2.4.2.1 Cigomicetos en BMC	21
2.4.2.2 <i>Penicillium</i> en el BMC	22
2.4.2.3 <i>Aspergillus</i> en el BMC	23
2.4.2.4 Hongos Patógenos en el BMC	24
2.4.3 Hongos encontrado en la Turba	24
2.4.4 Caracterización de Especies	26
2.5 Conclusión	79
2.6 Literatura citada	81
2.7 Apéndice	85
3. DETERMINAR LA PRESENCIA O AUSENCIA DE COLIFORMES Y <i>Salmonella</i> spp. EN EL BIOSÓLIDO MUNICIPAL COMPOSTADO Y LA TURBA	
3.1 Resumen	86
3.2 Introducción	87
3.3 Materiales y Métodos	89
3.3.1 Determinación de la presencia o ausencia de <i>E. coli</i> y coliformes totales	89
3.3.2 Detección de bacterias con el método Colilert®-18 (Quantitray-2000)	90
3.3.3 Detección de la presencia de coliformes totales	90
3.3.3.1 Identificación de las bacterias mediante el método BIOLOG®	91
3.3.4 Determinación de la presencia o ausencia de <i>Salmonella</i> spp.	91
3.4 Resultados y Discusión	92
3.4.1 Determinación de la presencia o ausencia de <i>E. coli</i> y coliformes totales	92
3.4.2 Detección de bacterias con el método Colilert®-18 (Quantitray-2000)	96
3.4.3 Detección de la presencia de coliformes totales	100
3.4.3.1 Identificación de las bacterias mediante el método BIOLOG®	100
3.4.4 Determinación de la presencia o ausencia de <i>Salmonella</i> spp.	102
3.5 Conclusiones	104
3.6 Literatura citada	105

4. DETECCIÓN DE COLIFORMES EN PLANTAS DE LECHUGA (*Latuca sativa* var. Black Seeded Simpson) CRECIDAS EN BIOSÓLIDO MUNICIPAL COMPOSTADO Y LA TURBA

4.1 Resumen	108
4.2 Introducción	109
4.3 Materiales y Métodos	111
4.3.1 Detección de <i>E. coli</i> y coliformes totales en el tejido de lechuga	111
4.3.1.1 Detección de <i>E. coli</i> y coliformes totales por el método Colilert®-18 (Quantitray-2000)	112
4.3.2 Detección de <i>Salmonella</i> spp. en el tejido de lechuga	112
4.4 Resultados y Discusión	112
4.4.1 Detección de <i>E. coli</i> y coliformes en el tejido de lechuga	112
4.3.1.1 Detección de <i>E. coli</i> y coliformes totales por el método Colilert®-18 (Quantitray-2000)	112
4.4.1.1 Identificación de las bacterias mediante el método BIOLOG®	119
4.3.2 Detección de <i>Salmonella</i> spp. en el tejido de lechuga	120
4.5 Conclusiones	122
4.6 Literatura citada	123

LISTA DE TABLAS

	PÁGINAS
Tabla 2.1 Colonias de hongos en medio OHIO después de 7 días de incubación a 28° y 45° C	19
Tabla 2.2 Cantidad de colonias de hongos identificados en los tratamientos de Biosólido Municipal Compostado (BMC) y turba	27
Tabla 3.1 Número más probable (NMP) de coliformes totales en Biosólido Municipal Compostado (BMC) y turba	97
Tabla 4.1 Número más probable (NMP) de coliformes totales en el tejido de plantas de lechuga crecidas en BMC y turba	114

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINAS
Fig. 2.1 <i>Aspergillus caespitosus</i>	28
Fig. 2.1.1 <i>Aspergillus caespitosus</i>	29
Fig. 2.2 <i>Aspergillus candidus</i>	32
Fig. 2.3 <i>Aspergillus flavus</i>	34
Fig. 2.3.1 <i>Aspergillus flavus</i>	35
Fig. 2.4 <i>Aspergillus fumigatus</i>	37
Fig. 2.5 <i>Aspergillus</i> spp. M	39
Fig. 2.5.1 <i>Aspergillus</i> spp. M	40
Fig. 2.6 <i>Conidiobolus heterospus</i>	42
Fig. 2.7 <i>Curvularia lunata</i>	44
Fig. 2.8 <i>Mucor mucedo</i>	46
Fig. 2.9 <i>Paecilomyces varioti</i>	48
Fig. 2.10 <i>Penicillium citreonigrum</i>	50
Fig. 2.10.1 <i>Penicillium citreonigrum</i>	51
Fig. 2.11 <i>Penicillium citrinum</i>	53
Fig. 2.12 <i>Penicillium implicatum</i>	55
Fig. 2.12.1 <i>Penicillium implicatum</i>	56
Fig. 2.13 <i>Penicillium</i> spp. A	58
Fig. 2.13.1 <i>Penicillium</i> spp. A	59
Fig. 2.14 <i>Penicillium</i> spp. F	61
Fig. 2.14.1 <i>Penicillium</i> spp. F	62
Fig. 2.15 <i>Pennicillium</i> spp. G	64
Fig. 2.16 <i>Penicillium</i> spp. H	66

Fig. 2.17 <i>Penicillium</i> spp. N	68
Fig. 2.17.1 <i>Penicillium</i> spp. N	69
Fig. 2.18 <i>Penicillium</i> spp. O	71
Fig. 2.19 <i>Rhizopus</i> spp.	73
Fig. 2.20. <i>Scopulariopsis</i> spp.	75
Fig. 2.20.1 <i>Scopulariopsis</i> spp.	76
Fig. 2.21 <i>Trichoderma harzianum</i>	78
Fig. 3.1 Crecimiento en agar MI (BMC)	94
Fig. 3. 2 Crecimiento en agar MI (TC)	95
Fig. 3.3 Resultados para la presencia de coliformes totales utilizando el método Colilert	98
Fig. 3.4 Resultados para la presencia de <i>E. coli</i> utilizando el método Colilert	99
Fig. 4.1 Crecimiento en agar MI para los tratamientos de lechuga bajo luz ambiente	115
Fig. 4.2 Crecimiento en agar MI para los tratamientos de lechuga bajo luz ultravioleta	116
Fig.4.3 Resultados positivos para la presencia de coliformes totales en lechuga	118
Fig. 4.4 Resultados negativos para la presencia de <i>E. coli</i> en lechuga	119
Fig. 4.5 Resultado para la prueba TECRA <i>Salmonella</i> para muestras de lechuga	121

1. INTRODUCCIÓN

El biosólido municipal compostado (BMC) experimentalmente ha demostrado ser un medio de cultivo alternativo en la producción de plantas ornamentales (Vázquez, 2004 y Cardona, 2008) y como enmienda en los suelos agrícolas (Erich et al., 2002). Investigaciones previas realizadas en la Universidad de Puerto Rico en Mayaguez han reportado que el BMC posee alta capacidad de proveer nutrientes (Vázquez, 2004) que mejoran la estructura del suelo, siendo una alternativa en la bioremediación (EPA, 1998). Este sustrato, posee una gran diversidad de microorganismos antagonistas efectivos en el control de patógenos (EPA, 1998).

El BMC ha sido adoptado por algunos productores de plantas ornamentales en Puerto Rico, reduciendo así el uso de la turba y los costos de producción (Alvarado, 2006). Aun así, existe cierto escepticismo en algunas personas para utilizar este medio como sustrato en plantas ornamentales o enmienda al suelo por entender que puede ser nocivo a la salud (EPA, 1999). Es por lo antes expuesto, que esta investigación propone estudiar la composición microbiana del BMC.

OBJETIVOS

1. Identificar los géneros y especies de hongos fitopatógenos y antagonistas presentes en el BMC.
2. Determinar la presencia o ausencia de bacterias (coliformes) en el BMC que puedan ser nocivos a los seres humanos.
3. Evaluar el uso del BMC como sustrato alternativo a la turba en plantas ornamentales y cultivos hortícolas.

1.1 REVISIÓN DE LITERATURA

1.1.1 Medios de Cultivo

1.1.1.1 Biosólido Municipal Compostado

El biosólido municipal compostado (BMC) es el producto del proceso de reciclaje que ocurre a través de la compostación de los desechos orgánicos y sólidos en aguas sanitarias (EPA, 1999). Los desechos orgánicos en las aguas residuales, no compostados representan un problema difícil de disposición ya que son un contaminante ambiental. Comúnmente la forma de disponer de estos desechos es depositándolos en los mares o vertederos (Yanco, 1988). El compostaje de los biosólidos se realiza con fines agrícolas para ser utilizado como enmienda en los suelos por su alta capacidad de proveer nutrientes (EPA, 1999). El proceso para obtener el BMC se inicia con tratamientos a las aguas sanitarias, separando los sólidos del líquido, éstos son mezclados con madera de paletas industriales y residuos de material vegetal para formar así el sustrato. La madera y el material vegetal en esta mezcla aumentan la porosidad y añaden otras fuentes de carbono para el desarrollo de los microorganismos responsables de la compostación (EPA, 2007).

De acuerdo con la Regulación 503 (40 CFR-503) (EPA, 2007) la cual rige los procesos de compostación de biosólidos, las condiciones óptimas incluyen el paso de la composta por cuatro fases. La primera fase es mesofílica, esta ocurre en los primeros dos a tres días de la formación de la pila. Durante esta fase las temperaturas se encuentran alrededor de 30° a 40° C. La segunda fase es termofílica, comienza a los cinco días de la formación de la pila y puede durar meses de acuerdo a las condiciones de compostación. Es durante esta fase que se alcanzan las temperaturas de hasta 55 ° a 60 ° C. La regulación exige que las temperaturas permanezcan entre 45 ° y 55 ° C durante 21 días para la destrucción de los microorganismos patógenos (EPA, 2007). Al terminar esta fase se inicia la curación en la que se mantienen temperaturas de 40 °C las cuales son adecuadas para la recolonización de microorganismos mesofílicos. Finalmente el sustrato

alcanza la etapa de maduración, cuando este se encuentra almacenado en las plantas de composta (Taiwo y Oso, 2004).

El proceso de compostación de los biosólidos comienza produciendo pilas aerostáticas que tardan alrededor de tres a cuatro semanas en descomponerse. Luego de completada la etapa de compostaje se inicia la curación y maduración del sustrato. De acuerdo con la Regulación 503 (EPA, 2007) las pilas aerostáticas son pilas que se suplementan con oxígeno a través de unos sistemas de ventiladores que se ubican bajo la pila. Las pilas son mezcladas frecuentemente para permitir la entrada de oxígeno, humedad y asegurar que la temperatura sea homogénea en todo el sustrato, manteniendo la temperatura de compostación entre 55 a 60 ° C. A estas temperaturas se destruyen microorganismos patógenos (EPA, 1998).

La planta de composta que suple el BMC a ser evaluado sigue la reglamentación 503. De acuerdo a esta regulación los biosólidos compostados se clasifican según el contenido bacterias coliformes. El BMC puede ser clasificado en Clase A y Clase B. Se utiliza como unidad de medida o NMP (número mas probable) por gramo de sólidos. Esta unidad indica el número de coliformes fecales. Para la clase A, el índice debe ser valores menores de 1000 MPN mientras que para la clase B la densidad debe ser menor de 2000 MPN.

En busca de reducir los costos de producción y proveer un medio de cultivo a las plantas ornamentales que no afecte el ambiente, surge el uso de la composta de biosólidos municipales. La disponibilidad y precio del BMC representan una alternativa favorable para los productores de plantas ornamentales reduciendo los costos de producción (Alvarado, 2006). Ha sido demostrado experimentalmente, que el uso BMC en la producción de plantas produce excelentes resultados en cuanto calidad de la planta y supresión de patógenos en el medio de cultivo (Cardona, 2008). Estas características representan una ventaja reduciendo el uso de fertilizantes inorgánicos y químicos para el control de fitopatógenos y plagas

(EPA, 1998). Las propiedades físicas y químicas del BMC son superiores a las de otros sustratos alternos probados anteriormente en la producción de ornamentales (Vázquez, 2004).

Ingelmo et al., (1998) reporta que en España ya se ha reducido en un 50 por ciento del uso de la turba utilizando compostas de diferentes tipos incluyendo las de biosólidos. En Puerto Rico, muchos productores de ornamentales están utilizando proporciones del BMC en las mezclas para medios de cultivo reduciendo el uso de la turba y los costos de producción (Alvarado, 2004). El BMC tiene un costo en la planta de composta de 12 dólares la yarda cúbica (0.91 metro cúbico) mientras la turba, el sustrato comúnmente usado en las mezclas comerciales tiene un precio de venta al por mayor de 17 dólares, 3.8 pies cúbico (.076 metros cúbico). El uso del BMC como medio de cultivo puede estar afectado por el escepticismo en algunas personas por entender que puede ser nocivo a la salud debido a su fuente de origen y el contenido microbiológico (EPA, 1999).

1.1.1.2. Turba

La turba es un recurso costoso, no renovable fácilmente y no reusable. Existe preocupación por este recurso debido a la destrucción que ocurre a gran escala en el momento de extraer el musgo de su habitáculo natural (Anderson, 1993). La turba es extraída de los suelos con unas aspiradoras cuando las condiciones ambientales de sequía y cantidad de sol son adecuadas para su secado (The Canadian Sphagnum Peat Moss Association, 2012). El proceso de secado continúa en plantas de procesamiento, donde la turba se almacena en pilas para luego ser empacada. Durante este tiempo en que la turba está expuesta al ambiente existe el riesgo de contaminación con hongos y bacterias patógenas (Cormier et al., 1998).

Estudios por Meriaux et al., (2006) reportan la presencia de altas concentraciones de esporas de hongos y bacterias en el ambiente de las plantas de procesamiento de la turba, representando un problema de contaminación y calidad del sustrato. En la turba madura se han identificado hongos termotolerantes como *Aspergillus*

fumigatus. Esta especie tiene la capacidad de sobrevivir a temperaturas de alrededor de 45 a 55° C (Airaksinen et al., 2005). En estudios de la flora microbiana natural del musgo *Sphagnum*, el cual es la fuente de origen de la turba, se han encontrado las bacterias patógenas tales como *Staphylococcus*, *Hafnia*, *Yersinia* y *Pantoea* (Tyler y Triplett, 2008). Este hallazgo representa la posibilidad de la presencia de alguna de estas bacterias patógenas a humanos en el sustrato comercial de la turba por estar asociadas al musgo.

1.1.2 Microorganismos presentes en el BMC

Los procesos de compostación y purificación del BMC son realizados por la acción de grupos de microorganismos como son las bacterias y hongos (Taiwo y Oso, 2004). Las poblaciones de estos microorganismos varían según las etapas de compostación en las que fluctúan las temperaturas (EPA, 1998). Los hongos y las bacterias mesofílicas abundan en el periodo inicial de la composta y los actinomicetos se mantienen en la fase termofílica (EPA, 1998). Los microorganismos mesofílicos colonizan nuevamente la composta durante la fase de curación (Taiwo y Oso, 2004).

1.1.2.1 Hongos

Las poblaciones de hongos en sustratos orgánicos, como las compostas incluyen una gran diversidad de especies (Swier et al., 2011). Se han identificado alrededor de 122 especies de hongos de los géneros: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Mortierella*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Talaromyces*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Scopulariopsis* y *Alternaria* (Taiwo y Oso, 2004 y Bonito et al., 2010). Se ha estimado que de 1.5 millones de especies de hongos que se encuentran presentes en el suelo, sólo se han identificado un 5 a 10 por ciento (Hawksworth, 2001). La caracterización de hongos en el proceso de compostación de biósólidos no han sido descritas claramente en relación a la biodiversidad presente (Bonito et al., 2010). La diversidad de hongos existentes en los sustratos permiten comprender la complejidad de roles que desempeñan estos microorganismos en los ecosistemas agrícolas (Swier et al., 2011).

Los hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* han sido reportados en las compostas (EPA, 1998). Estos requieren temperaturas entre 55 a 60°C por 21 días para ser erradicados del sustrato. La mayoría de hongos fitopatógenos se encuentran bajo este rango de temperaturas siendo eliminados en la fase termofílica de la composta. Sin embargo, algunos de ellos recolonizan en la fase de maduración cuando el sustrato es almacenado (Ryckeboer et al., 2002). *Aspergillus fumigatus*, patógeno a los humanos, ha sido encontrado en el BMC lo que implica un mayor riesgo a la salud. Este ha sido reportado en el BMC durante las diferentes fases de compostación, sin embargo, en la fase de maduración el hongo no representa peligro ya que la cantidad de propagulos es mínima (Millner et al., 1977).

1.1.2.2 Bacterias

La diversidad bacteriana de la composta es muy variada de acuerdo a sus características patogénicas o antagonistas, siendo en su mayoría bacterias comunes pobladoras del suelo. La flora bacteriana del BMC está influenciada por las variaciones en temperatura del proceso de compostaje (Ryckeboer et al., 2002). Taiwo y Oso, (2004) reportaron la presencia de bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y coliformes como *Streptococcus*, *Proteus* y *Serratia* durante el periodo de curación, bajo temperaturas mesofílicas.

1.1.2.2.1. Coliformes

Las bacterias coliformes corresponden a la flora normal del suelo, vegetación y agua (EPA, 2002). Estas pertenecen al grupo de las Enterobacterias las cuales tienen la capacidad de colonizar el interior de las plantas y desarrollarse como patógenos oportunistas. El grupo posee resistencia a antibióticos y sobreviven por largo tiempo en el suelo (Tyler y Triplett, 2008). Los géneros bacterianos: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter* y *Proteus* son los más comunes encontrados en el interior de las plantas (Tyler y Triplett, 2008).

Las bacterias clasificadas como coliformes fecales corresponden a un subgrupo dentro de los coliformes siendo estas nocivas a la salud (EPA, 2002). Estas se encuentran en sistemas digestivos y excrementos humanos y de animales. *Escherichia coli* es uno de los coliformes fecales más comunes que se encuentra presente en el sistema digestivo de humanos y animales. La mayoría de las especies de *E. coli* no son peligrosas, excepto la de *E. coli* 0157:H7 ya que puede causar fiebre, vomitos, diarea entre otras complicaciones. La presencia del grupo de los coliformes fecales en un sustrato es indicador de contaminación fecal y representa riesgo a la salud (Yanco, 1998 y EPA, 2002). De igual modo, *Salmonella* spp. representa una preocupación ya que es una bacteria patogénica y común en biosólidos (Hussong et al, 1985). *Salmonella* spp. es erradicada a partir del día 25 en el que la composta se ha mantenido a temperaturas de 55 a 60°C (Hassen et al., 2001). La recolonización de *Salmonella* spp. en el sustrato es posible durante la fase en la que ocurre la disminución de temperatura ya que la cantidad de bacterias aumenta gradualmente en el ambiente (Hussong et al., 1985).

E. coli y *Salmonella* spp. han sido reportadas en suelos que han recibido enmiendas de BMC así como en los cultivos crecidos en estos suelos (Tyler y Triplett, 2008). Estudios del transporte de bacterias coliformes a través de las diferentes capas del suelo después de la aplicación de composta indican que pueden encontrarse a profundidades de 0.9 hasta 456 m según el tipo de suelo (Gagliardi y Karns, 2000). También, existe una microflora bacteriana antagonista en la composta que incluye a *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida* que inhiben que *Salmonella* y *E. coli* recolonicen la composta y sean detectadas en los cultivos (Tyler y Triplett, 2008).

1.1.3 ACCIÓN MICROBIANA EN EL BMC

1.1.3.1 Microorganismos Antagonistas

Los microorganismos antagonistas comúnmente son aislados de sustratos orgánicos en descomposición como lo son las compostas (Swier et al., 2011). La capacidad antagonista de un microorganismo es la acción de éste para suprimir a un patógeno de modo que éste no afecte ni cause daño (Hoitink et al., 1996). Los mecanismos de supresión envueltos en el control de patógenos son la competencia, antibiosis, hiperparasitismo y la inducción de resistencia sistémica (EPA, 1998). Un microorganismo antagonista promueve el crecimiento las plantas mejorando el rendimiento de estas (Khan et al., 2008). Los hongos antagonistas actúan como agentes biológicos reduciendo el uso de fungicidas sintéticos. Esto implica una reducción en costos de producción agrícola así como también en el impacto ambiental de esos químicos (Hoitink et al., 1996 y EPA, 1998).

El BMC es considerado uno de los sustratos orgánicos con mayor número de microorganismos con carácter supresivo (EPA, 1998). Algunos de los antagonistas encontrados en la composta son los hongos *Trichoderma* spp. *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. y las bacterias *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. Estos microorganismos son efectivos en el control de hongos fitopatógenos del suelo como *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia* spp. (EPA, 1998). Estudios realizados por Tyler y Triplett, (2008) con las bacterias *Pseudomonas putida* y *P. fluorescens*, demuestran su utilización en biocontrol por su capacidad de suprimir la acción de muchos de los microorganismos patógenos.

El efecto como biocontrolador de los microorganismos antagonistas en el BMC puede variar de acuerdo a los cambios en las condiciones ambientales, el periodo de compostación adecuado y la capacidad de activación de los antagonistas presentes (Hoitink et al., 1996). Se ha comprobado que de acuerdo al lote de composta, la acción de los mecanismos de supresión de los microorganismos en las compostas varía (EPA, 1998). Los efectos de supresión de microorganismos

patógenos de la composta son mayor efecto que en la turba por poseer una mayor diversidad de microorganismos de carácter antagónico (EPA, 1998).

1.1.3.2 Efectos de Solubilización de los Microorganismos en el BMC

La acción microbiana de hongos y bacterias en el BMC incluye la producción de ácidos orgánicos e inorgánicos, como parte de su metabolismo. Estos compuestos contribuyen a la solubilización de minerales y nutrimentos en los suelos (Sayer et al., 1995). El mecanismo de solubilización de estos compuestos causa un efecto en la disminución de pH (Whitelaw, 2000). Esto causa que la quelación de los cationes de calcio, hierro o aluminio a los que están unidos los nutrimentos como el fósforo se transformen a formas solubles en agua (Sayer et al., 1995). De acuerdo con Whitelaw, (2000), los microorganismos encontrados en el BMC, tienen la capacidad de modificar la composición mineral de los suelos en los que son inoculados como enmiendas. En suelos donde los nutrimentos como el fósforo no están disponibles a las plantas se ha observado un efecto de liberación de nutrimentos luego de la inoculación con microorganismos solubilizadores (Whitelaw, 2000) o luego aplicaciones de BMC (Erich et al., 2002).

Hongos con propiedades solubilizadoras encontrados en el BMC pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma* (Valenzuela et al., 2002). Estos hongos reducen el periodo de compostación acelerando el proceso mediante la solubilización y mejorando la calidad del sustrato (Gaur et al., 1982). Investigaciones han reportado un efecto mayor de solubilización por *A. niger* y *Penicillium* sp. (Gaur et al., 1982). Las bacterias: *Pseudomonas putida* biotype A, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus mycoides* y *Bacillus thuringiensis* poseen características de solubilización (Khan et al., 2009). Éstas en su mecanismo de solubilización generan fosfatasa, una enzima que hidroliza los enlaces orgánicos fosfatados liberando aniones fosfato. Otro mecanismo de solubilización es la producción de ácidos orgánicos como el ácido glucónico (Whitelaw, 2000).

El efecto de solubilización en los suelos que ofrecen los microorganismos presentes en el BMC representa una alternativa para reducir el uso de fertilizantes

inorgánicos (Khan et al., 2009). El uso intensivo de fertilizantes inorgánicos contribuye a la contaminación de los suelos reduciendo la microflora beneficiosa y la diversidad de especies (Swier et al., 2011). En cambio las compostas tienen una liberación lenta de nutrientes aumentando la probabilidad de que éstos sean absorbidos por los cultivos, en vez de perderse fuera de los campos agrícolas hacia las fuentes cercanas de agua subterránea o superficie (Erich et al., 2005).

1.2 LITERATURA CITADA

Alvarado, B. J. 2006. *Análisis económico de medio orgánico como alternativa a las mezclas comerciales utilizando turba para la producción de plantas ornamentales en tiestos*. Tesis, Departamento de Economía Agrícola, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. pp 16-18.

Anderson, A. R. 1993. Peat Moss in Nova Scotia. Department of Natural Resources Branch. Information Circular M-E 18, Second Edition.

Airaksinen, S., M. L. Heiskanen, H. Heinonen-Tanski, J. Laitinen, S. Laitinen, M. Linnainmaa, S. Rautiala. 2005. Variety in dustiness and hygiene quality of peat bedding. *Annals of Agriculture and Environmental Medicine*. 12, 53–59.

Bonito, G. O., S. Isikhuemhen, R. Vilgalys. 2010. Identification of fungi associated with municipal compost using DNA-based techniques. *Bioresource Technology*. 101(3): 1021-1027.

Cardona, L. I. 2008. *Efectos del biosólido municipal compostado como medio de cultivo alternativo a la turba utilizado en la producción de pascuas (Euphorbia pulcherrima Willd. ex Klotzsch)*. Tesis, Universidad De Puerto Rico Recinto Universitario de Mayagüez. pp 38- 45.

Cormier, Y. E. Israël-Assayag, G. Bédard, C. Duchaine. 1998. Hypersensitivity pneumonitis in peat moss processing plant workers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*;158:412–417.

Environmental Protection Agency (EPA). 1998. An analysis of composting as an environmental remediation technology, Capítulos 1 y 5: 1-3.

Environmental Protection Agency (EPA). 1999. Biosolids generation, use, and disposal in the United States. Section 5.2.1 Public Acceptance. 69-73.

Environmental Protection Agency (EPA). 2002. Method 1604: Total Coliforms and *Echerichia coli* in water by Membrane Filtration using a simultaneous detection technique (MI Medium). EPA 821-R-02-024, Office of Water, Environmental Protection Agency, Washington DC.

Environmental Protection Agency (EPA). 2007. Standards for the use or disposal of sewage sludge. Title 40: Protection of Environment (503):15-22.

Erich, M. S., C. B. Fitzgerald y G. A. Porter. 2002. The effect of organic amendments on phosphorus chemistry in a potato cropping system. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 88(1): 79-88.

Gaur, A. C., K. V. Sadasivam, R. S. Mathur, y S. P. Magu. 1982. Role of mesophilic fungi in composting. *Agricultural Wastes*. 4(6):453-460.

- Gagliardi, J.V. y J. S. Karns. 2000. Leaching of *Escherichia coli* O157:H7 in Diverse Soils under Various Agricultural Management Practices. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(3):877–883
- Hassen, A., K. N. Belguith, A. Jedidi, M. Cherif, A. Cherif y A. Boudabous. 2001. Microbial characterization during composting of municipal solid waste. *Bioresource Technology*. 80(3):217-225.
- Hawksworth, D. L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*. 105: 1422-1432.
- Hoitink, H. A. J., A. G. Stone y D. Y. Han. 1996. Suppression of plant diseases by composts. X Congreso Nacional Agronómico, III Congreso de Fitopatología, San José, Costa Rica. 47-52.
- Hussong, D., W. D. Burge y N. K. Enkiri. 1985. Occurrence, growth, and suppression of salmonellae in composted sewage sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. 50(4):887-893.
- Ingelmo, F., R. Canet, M. A. Ibañez, F. Pomares y J. García. 1998. Use of MSW compost, dried sewage sludge and other wastes as partial substitutes for peat and soil. *Bioresource Technology*. 63(2): 123-129.
- Khan, A. A., G. Jilani, M. S. Akhtar, S. M. Saqlan- Naqvi y M. Rasheed. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria for crop production. *Journal Agriculture Biological Sciences*. 1(1):48-58.
- Khan, S. A., M. Hamayun, H. Yoon, H. Y. Kim, S. J. Suh, S. K. Hwang, J. M. Kim, I.J. Lee, Y. S. Choo, U. H Yoon, W. S Kong, B. M. Lee y J. G. Kim. 2008. Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. *BioMed Central Microbiology*. 8:231.
- Meriaux, A., P. Pageau, Y. Cormier, N. Goyer y C. Duchaine. 2006. Bioaerosols in peat moss processing plants. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 3(8):408-17.
- Millner, P. D, P. B Marsh, R. B Snowden y J. F. Parr. (1977) Occurrence of *Aspergillus fumigatus* during composting of sewage sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. 34, (6): 765-772.
- Ryckeboer, J., J. Mergaert, J. Coosemans, K. Deprins y J. Swings. 2003. Microbiological aspects of biowaste during composting is monitored compost bin. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 127–137.
- Sayer, J. A., S. L. Raggett y G. M. Gadd. 1995. Solubilization of insoluble metal compounds by soil fungi development of a screening method for solubilizing ability and metal tolerance. *Mycological Research*. 99(8):987-993.

- Swier, H., M. S. Dkhar y H. Kayang. 2011. Fungal population and diversity in organically amended agricultural soils of Meghalaya, India. *Journal of Organic Systems*. 6(2): 3-12.
- Taiwo, L. B. y B. A. Oso 2004. Influence of composting techniques on microbial succession, temperature and pH in a composting municipal solid waste. *African Journal of Biotechnology*. 3(4): 239- 243.
- The Canadian Sphagnum Peat Moss Association. 2012. Harvesting Peat in Canada. <http://www.peatmoss.com/>.
- Tyler H. L. y E. W. Triplett 2008. Plants as a Habitat for Beneficial and or Human Pathogenic Bacteria. *Annual Review Phytopathology*. 46: 53-73.
- Valenzuela, E., S. Barreras y D. Pinochet. 2002. Solubilización de roca fosfórica – Carolina del Norte con cepas de *Apergillus niger* aisladas desde un suelo trumao. Recuperado de <http://www.uv.cl.com>. 28/8/2009.
- Vásquez, J. C. 2004. *Absorción y lixiviación de Nitrógeno y Fosforo en sustrato a base de Biosólido Municipal Compostado*. Tesis, Universidad de Puerto Rico Recinto Universitario de Mayagüez. pp 48-49, 72.
- Yanco, W. A. 1988 Occurrence of pathogens in distribution and marketing municipal sludges. Research and Development Environmental Protection Agency, EPA/600/S1-871014.
- Whitelaw, M. A. 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*. 69: 99-151.

2. CARACTERIZACIÓN DE HONGOS PRESENTES EN EL BIOSÓLIDO MUNICIPAL COMPOSTADO Y LA TURBA

Grisselle E. Pérez Sánchez ¹, María Del Carmen Librán Salas², Lydia Rivera Vargas² y Myrna Alameda Lozada ²

¹ Estudiante Graduada y ² Catedráticas Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez.

2.1 RESUMEN

El biosólido municipal compostado (BMC) contiene una diversidad de microorganismos entre los que se incluyen hongos, bacterias y actinomicetos. Entre estos grupos se destacan los hongos, por presentar características como la supresión de microorganismos patógenos y la solubilización de nutrientes. Estas características favorecen el uso del BMC como medio alternativo a la turba y enmienda a los suelos agrícolas. Sin embargo, el uso del BMC puede ser censurado por contener microorganismos patógenos a los humanos y a las plantas. Es por esta razón, el objetivo de este trabajo fue la identificación y caracterización de los hongos presentes en el BMC. El BMC se obtuvo de la Planta de Composta de la Autoridad de Acueductos y Alcantarillados de Mayagüez. Las muestras analizadas se obtuvieron de pilas aerostáticas diferentes. Los tratamientos utilizados fueron: BMC del 18-11-2009 (T1), BMC del 4-12-2009 (T2), BMC del 29-10-2010 (T3), BMC del 22-10-2010 (T4) y control, Turba 100% (T5), los mismos fueron replicados tres veces. Se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} a 10^{-4} a partir de 10 g de cada tratamiento. Las diluciones se transfirieron a medio de agar OHIO y se incubaron a 28° y 45° C. En todos los tratamientos de BMC y turba se observó crecimiento a 28° C y a 45° C solo en T5 Control. Se seleccionaron tres colonias de hongos al azar por plato Petri, las cuales se crecieron en medio de agar de papa y dextrosa acidulado para su identificación por género. Se identificaron 21 especies de hongos presentes en el BMC y la turba. Los géneros identificados se incluyen: *Aspergillus* sp., *Conidiobolus* sp., *Curvularia* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Trichoderma* sp., y *Scopulariopsis* sp. Los hongos identificados en el BMC son

clasificados como saprófitos y antagonistas. Se identificó a *Aspergillus fumigatus* en muestras de turba. Esta especie se ha reportado como patógeno humano.

2.2 INTRODUCCIÓN

El biosólido municipal compostado (BMC) es el resultado final del proceso de reciclaje de los desechos orgánicos y sólidos en aguas sanitarias. El compostaje del biosólido se realiza con el propósito de ser utilizado como enmienda en los suelos agrícolas, por su alta capacidad de proveer nutrientes, mejorar la estructura del suelo y para la bioremediación (EPA, 1998). El BMC también ha sido estudiado para ser usado como un sustrato alternativo a la turba, siendo un componente en las mezclas de medios de cultivo (Cardona, 2008). Su uso ya ha sido adoptado por algunos productores de plantas ornamentales en Puerto Rico reduciendo así el uso de la turba y los costos de producción (Alvarado, 2006). Existe cierto escepticismo en algunas personas para utilizar este medio como sustrato en plantas ornamentales o enmienda al suelo (EPA, 1999). Muchos productores piensan que puede ser nocivo a la salud. Por lo antes expuesto, existe la necesidad de investigar e identificar la posible presencia de hongos nocivos tanto para plantas como para humanos.

El proceso de compostaje del BMC es aeróbico por medio de pila aéreo-estática combinando fases mesofílicas y termofílicas. Durante el proceso de descomposición y purificación actúan de varios grupos de microorganismos como las bacterias, actinomicetos y hongos (Taiwo y Oso, 2004). La diversidad en las poblaciones de microorganismos varía según los cambios en la temperatura (EPA, 1998). Los hongos mesofílicos abundan en el periodo inicial, en cambio los actinomicetos se mantienen en la fase termofílica en la que se alcanzan temperaturas de hasta 65° C. Es bajo estas condiciones que microorganismos patógenos son eliminados (EPA, 1998). Los microorganismos mesofílicos colonizan nuevamente la composta al disminuir la temperatura en la fase conocida como curación. Las investigaciones realizadas para determinar la diversidad de microorganismos han identificado hongos mesofílicos como *Aspergillus*, *Fusarium*,

Penicillium, *Cladosporium*, *Cephalosporium*, *Mycotypha*, *Scopulariopsis*, *Aureobasidium*, *Alternaria alternata* y *Epicoccum* durante la fase inicial. *Aureobasidium*, *Alternaria alternata* y *Epicoccum* no sobreviven la fase termofílica ni recolonizan en la fase de curación (Taiwo y Oso, 2004). De acuerdo a Bonito et al., (2010), las caracterizaciones de hongos durante el proceso de compostación de biósólidos no han sido claras en cuanto a la diversidad presente.

Las compostas que no han completado por el periodo necesario alguna de las fases de curación están en riesgo de contener microorganismos patógenos (Guzmán y Campos, 2001). La Agencia de Protección Ambiental (EPA) regula el control de patógenos en los biosólidos compostados mediante pruebas requeridas para autorizar su uso. Estas pruebas son específicas para coliformes fecales y no evalúan otros microorganismos como hongos o bacterias patógenas a las plantas y al humano (Guzmán y Campos, 2001). Por lo que es necesario un monitoreo en la sucesión microbiana para determinar el manejo efectivo y asegurar la calidad del producto (Ryckeboe et al., 2003). La diversidad de microorganismos en la composta incluye microorganismos con carácter supresivo. Su utilización como biocontrol está sujeta a los cambios en condiciones ambientales y en el periodo de compostaje adecuado (EPA, 1998). Por tal razón, los mecanismos de supresión varían con el lote de composta.

Los microorganismos encontrados en el BMC, principalmente los hongos, tienen la capacidad de modificar la composición mineral de los suelos en los que son inoculados como enmiendas (Whitelaw, 2000). Esto es debido a su acción solubilizadora que ocurre con la liberación de ácidos orgánicos producidos por los microorganismos como parte de su metabolismo (Sayer et al., 1995). Las aplicaciones continuas de BMC en suelos en los que los nutrientes tales como el fósforo no están disponibles, provoca la liberación de los mismos siendo estos disponibles a la plantas (Whitelaw, 2000). Los hongos con propiedades solubilizadoras encontrados en el BMC comúnmente pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma* (Valenzuela et al., 2002).

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Caracterización de hongos en el BMC y la turba

El biosólido municipal compostado se obtuvo de la planta de composta de la Autoridad de Acueductos y Alcantarillados de Mayagüez, Puerto Rico. Las compostas varían según el lote de producción al cual pertenecen y en su composición. Estas compostas cumplen con el periodo de compostación requerido por la EPA para autorizar su uso. Se caracterizaron hongos en cinco tratamientos de compostas y turba comercial. Las compostas varían de acuerdo al tiempo de compostación que posee su respectiva pila aerostática (las fechas indican el tiempo en el que cada pila completó el proceso de compostaje). Los tratamientos evaluados fueron los siguientes; T1 (BMC- 18 de noviembre de 2009), T2 (BMC- 4 de diciembre de 2009) de los que se tomaron muestras el 19 de febrero de 2010, los tratamientos T3 (BMC- 29 de octubre 2010) y T4 (BMC- 22 de octubre de 2010) fueron obtenidos de la planta de composta el 11 de febrero de 2011. El tratamiento control, T5 contenía 100% de turba comercial, (Pro-Moss TBK[®]) que fue obtenida de un paquete sellado. Se tomaron 10 gramos de cada tratamiento y se añadieron 90 ml de agua destilada estéril. La solución fue agitada por 15 minutos en un agitador mecánico. A partir de esta solución se realizaron diluciones en serie de 10^{-1} a 10^{-4} de las que se extrajo 100 μ l que fueron transferidos a placas Petri que contenían medio de cultivo OHIO (Dhingra y Sinclair, 1995) (Apéndice 2.7). La dilución se esparció sobre el medio de cultivo en la placa Petri con un dispensador estéril sobre un plato giratorio. Se inocularon 6 placas Petri por dilución (Taiwo y Oso, 2004). Se incubaron en posición invertidas 3 placas en cada una de las temperaturas de 28° y 45° C, estas temperaturas se utilizan para el estudio de hongos mesofílicos y termofílicos, respectivamente. Las muestras incubadas fueron observadas diariamente por 5 a 7 días. Se tomaron tres colonias al azar (Millner et al, 1977) que fueron transferidas a placas Petri con agar de papa y dextrosa (PDA o Potato Dextrose Agar, BD DIFCO[™]) acidificado con 1ml de ácido láctico al 25% por cada 500 ml. Se prepararon laminillas a partir de cultivos puros para identificar mediante un

microscopio las estructuras reproductivas de los hongos utilizando claves taxonómicas. La clave utilizada para la identificación por género fue *Illustrated genera of imperfect fungi*, (Barnett y Hunter, 1998). Se siguieron las especificaciones y recomendaciones indicadas en las claves taxonómicas para la identificación de especies de hongos (Apendice 2.7). Las claves para los géneros de *Aspergillus* y *Penicillium* requieren el crecimiento de las colonias en los medios de cultivo CYA (Czapek Yeast Agar), CYA 20S (Czapek Yeast Agar+ 20 g Sacarosa) MEA (Malt Extract Agar) y GN25 (Nitrato de Glicerol 25%) (Apendice 2.7). Se utilizó la carta de colores de Munsell (2000) para las características de color. Las medidas de los caracteres microscópicos fueron tomadas con un microscopio (Olimpus BH-2) con cámara spot (insaid) equipado para la técnica de Nomarsky, utilizado el programa SPOT Advanced.

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 Caracterización de hongos en el BMC y la turba

2.4.1.1 Crecimiento de hongos en agar OHIO

Se observó crecimiento de hongos en todos los tratamientos conteniendo composta crecidos en medio agar OHIO a 28°C. A 45 ° C solamente se obtuvo crecimiento de bacterias en el BMC. Esto demuestra que los hongos termofílicos fueron eliminados del BMC durante el proceso de compostación a 45°C. La ausencia de hongos puede ser causada por crecimiento de bacterias termofílicas como lo es *Bacillus* spp. Este género fue identificado en el BMC en estudios previos realizados en Puerto Rico (Cardona, 2004). También, han sido reportadas por Taiwo y Oso, (2004) en un sustrato de composta similar al BMC. Estas bacterias poseen la capacidad de suprimir otros microorganismos como *Aspergillus fumigatus* (Agarry et al, 2005). Hongos tales como *A. fumigatus* y *Paecilomyces varioti* son termotolerantes y patógenos a humanos, estos fueron encontrados en el tratamiento T5 (100% Turba). En este tratamiento no se observó la presencia de bacterias a temperatura de 45 ° C.

En los tratamientos T1 y T2 se observó mayor diversidad de colonias de hongos crecidas en medio OHIO al comparar con los tratamientos T3 y T4 (Tabla 2.1). El análisis de varianza mostró diferencia significativa en tratamiento T2 al compararlo con los demás tratamientos en todas las diluciones. Los tratamientos (T3 y T4) corresponden a lotes de composta obtenidos, en 2011, un año más tarde de los primeros dos tratamientos (T1 y T2), estos contaban con más días de almacenamiento en la planta de composta. Al momento de obtener las muestras los tratamientos T1 y T2 habían sido almacenados por 94 y 78 días, respectivamente después de terminada su fase de compostación. Los tratamientos T3 y T4 habían sido almacenados por 106 y 113 días, respectivamente, al momento de obtener las muestras. En estos últimos dos tratamientos se observaron muy pocas colonias de hongos diferentes por plato Petri. Las colonias más abundantes y con mayor número de aislados eran de color blanco y apariencia aterciopeladas (Tabla 2.1 y Fig. 2.10). Estas colonias fueron identificadas como *Penicillium citreonigrum* o similares a esta especie (Pitt, 1985).

Tabla 2.1 Colonias de hongos en medio OHIO después de 7 días de incubación a 28° y 45° C				
Tratamientos¹	Diluciones			
	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴
T1 BMC	93B	58A	21A	15A
T2 BMC	(TMC)C	146B	62B	34B
T3 BMC	105B	35A	21A	3A
T4 BMC	78AB	28A	5A	4A
T5 Turba	15A	6A	5A	3A
T5 Turba ²	42	12	6	1

¹Tratamientos T1 (18 de noviembre de 2009), T2 (4 de diciembre de 2009) T3 (BMC- 29 de octubre 2010), T4 (22 de octubre de 2010) y T5 contenía 100% de turba comercial, (Pro-Moss TBK®)

² Incubados a 45° C

TMC (too many to count)

Los valores de la cantidad de colonias en cada tratamiento son un promedio de 3 placas Petri por tratamiento.

A y B indican las diferencias significativas entre los tratamientos con un ($p <= 0.05$). Las letras iguales indican que no hay diferencias.

En el tratamiento T3 fue identificado el género *Scopulariopsis* el cual es un poblador secundario de los sustratos ya que utiliza formas complejas de nitrógeno como fuente de alimento (Raper y Thom, 1968). Este habita la composta luego que poblaciones de *Penicillium* spp. han disminuido, completando el proceso de descomposición. Esto confirma el resultado encontrado en esta investigación sobre la ausencia de otros géneros de hongos en los tratamientos T3 y T4 al compáralos con los tratamientos T1 y T2 donde se encontró mayor diversidad de especies. Las compostas de los tratamientos T3 y T4 son sustratos con mayor tiempo de almacenamiento por lo que la diversidad de hongos ha disminuido. La diversidad de hongos en la composta es afectada por la disponibilidad de nutrientes en el sustrato, cada grupo de microorganismos en la composta utiliza los residuos orgánicos del grupo colonizador anterior completando la degradación del material compostado e influyendo en la diversidad de poblaciones según la fase de compostación (Taiwo y Oso, 2004).

La disminución en la población y diversidad de hongos durante el proceso de maduración de la composta puede ser provocada por factores ambientales como los cambios en temperatura, pH, humedad, y aereación los cuales ocurren en la pila luego de finalizado su proceso de compostación. El contenido de cada lote de composta varía de acuerdo a los aditivos que son añadidos a la mezcla de los lodos. Estos aditivos suelen ser triturados de las maderas de paletas industriales y material vegetal. La diversidad de microorganismos presentes en la composta puede ser afectada por el estado de descomposición y el tipo de material de los aditivos utilizados (Taiwo y Oso, 2004). Por tales razones, la flora microbiana de cada lote de composta varía en la diversidad de especies como en los mecanismos de supresión de antagonistas contra microorganismos fitopatógenos (EPA, 1998).

Los resultados obtenidos en esta investigación en cuanto a la microflora de hongos, confirman que el tiempo en que la composta ha terminado su fase de

curación es el momento óptimo para ser utilizada. En la fase de curación es donde se encuentra la mayor diversidad de hongos mesofílicos (Ryckeboer et al., 2003). En compostas en las que su fase de curación ha terminado iniciándose la maduración del sustrato, probablemente ocurra una reducción de hongos beneficiosos con capacidad antagonista y están en riesgo de contaminarse con patógenos ambientales durante su almacenamiento. La presencia de *Scopulariopsis* en la composta, T3 confirma la presencia de hongos que podrían ser patógenos al recolonizar la composta del BMC en el periodo de maduración y almacenamiento.

2.4.2 Hongos encontrados en el BMC

Los hongos encontrados en los tratamientos de BMC coinciden con los descritos en los estudios previos como mesofílicos (Taiwo y Oso, 2004). Estos poseen características de hongos saprófitos, antagonistas (Bonito et al., 2010) y solubilizadores (Whitelaw, 2000). En los tratamientos con composta, se identificaron hongos *Aspergillus*, *Conidiobolus*, *Curvularia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Scopulariopsis*, datos similares a lo reportado por Taiwo y Oso, (2004).

2.4.2.1 Cigomicetos en el BMC

Los aislados correspondientes a la división de los cigomicetos fueron más abundantes en los tratamientos T1 y T2, encontrándose en las diluciones más concentradas de 10^{-1} y 10^{-2} . En estudios previos se han identificado *Mucor* y *Rhizopus* en compostas lo que coincide con lo encontrado en este estudio (Ryckeboer et al., 2003 y Taiwo y Oso, 2004). Sin embargo, el género *Conidiobolus* identificado en esta investigación no había sido reportado en compostas analizadas en estudios previos. *Conidiobolus heterosporus* habita comúnmente el suelo y en desperdicios orgánicos en descomposición en regiones tropicales (Nelson et al., 1998). Éste ha sido reportado como flora microbiana del sistema digestivo de anfibios y reptiles (Nelson et al., 1998). Algunas especies de este género son patógenas a humanos y animales causando alergias

subcutaneas, no así la encontrada en este estudio (Kimura et al., 2010). Los cigomicetos identificados en esta investigación son hongos comunes del suelo y presentes en materia orgánica en descomposición, no han sido reportados como patógenos a las plantas ni a humanos.

2.4.2.2 *Penicillium* en el BMC

En todos los tratamientos con BMC se identificó el género *Penicillium* y la especie de *Penicillium citreonigrum*. También se identificaron especies como similares a *Penicillium citreonigrum* en caracteres morfológicos. Esta especie es uno de los hongos con mayor número de aislados en el BMC, aunque no fue posible la identificación de algunas de las colonias, clasificándolas como especies similares a otras. Esta condición es debida a la mutación ocasionada por las variaciones de temperatura, humedad que sufren estos microorganismos al ser crecidos en medios de cultivo como en su ambiente natural bajo las condiciones de compostación. Los cambios más notables son en el color textura de la colonia así como en el radio de crecimiento (Raper y Thom, 1968). Estos hongos no identificados podrían ser especies nuevas no descritas. Las especies encontradas fueron clasificadas como similares a *Penicillium citreonigrum* y *P. citrinum* con variaciones de color en la colonia y en el desarrollo de estas de acuerdo a las diferentes temperaturas en que fueron crecidas. *Penicillium citrinum* es descrita como una especie con una gran variedad de tonalidades, cambios en textura y modos de esporulación (Raper y Thom, 1968) *Penicillium citrinum* es un promotor de crecimiento de plantas que coloniza rápidamente las raíces con un patrón similar al de las micorrizas (Khan et al., 2008). Otras especies de *Penicillium* identificadas fueron *P. citreonigrum* y *P. implicatum*. Estos poseen propiedades antifúngicas contra hongos patógenos como *Pythium vexans* (Yamaji et al. 2005) y *Rhizoctonia solani* (Nicoletti et al., 2004) por la producción de micotoxinas como el citrin, frequentin y palitatin. Las micotoxinas producidas por estos hongos son ácidos compuestos con propiedades antifúngicas que mantienen a los patógenos bajo los niveles de competencia inhibiendo su desarrollo (Yamaji et al., 2005).

2.4.2.3 *Aspergillus* en el BMC

Las especies de *Aspergillus* identificadas en las compostas de los tratamientos T1 y T2 fueron: *A. caespitosus*, *A. candidus* y *A. flavus*. *Aspergillus caespitosus* tiene potencial como hongo antagonista por la producción de metabolitos secundarios con propiedades antiparasíticas y antimicrobiales (Guimaráes et al., 2006). Este hongo podría ser un excelente solubilizador del fósforo en el suelo por la producción de enzimas hidrolíticas. *Aspergillus candidus* es antagonista de *Phytophthora cinnamomi*, oomiceto fitopatógeno del aguacate y estudios previos han demostrado sus efectos positivos en mejorar el estado de los sistemas radicales (Duvenhage, 1999). Esta especie posee capacidad supresiva contra *Fusarium solani* en combinación con la presencia de otros hongos como *Aspergillus niger* y *Penicillium citrinum* (Ainbikapathy et. al., 2002). *Aspergillus flavus* ha sido descrito como un promotor de crecimiento y con características antagonistas contra *Macrophomina phaseolina*, un patógeno de la raíz de las leguminosas (Muhammad et al., 2010 y Ullah et al., 2011). *Aspergillus flavus* es antagonista de *Rhizoctonia solani* (Naim y El-Esawy, 1965). El mecanismo de acción contra este patógeno es creando adhesión a las hifas de *R. solani* por lo que retrasa el crecimiento del micelio, indicando parasitismo contra el patógeno (Ulacio et al., 2002).

La diversidad de microorganismos de carácter antagonista encontrados en el BMC es un factor favorable para su uso como medio de cultivo y como enmienda a suelos agrícolas. Su uso como medio alternativo a la turba comercial presenta una alternativa contra microorganismos fitopatógenos importantes de los cultivos hortícolas como lo son *Rhizoctonia solani* y *Pythium vexans*. Estos son patógenos comunes que atacan plantas tanto en tiestos como en condiciones de campo. Se ha confirmado la capacidad de supresión del BMC sobre microorganismos patógenos como superior al compararla con la que pueda proveer la turba (EPA, 1998).

2.4.2.4 Hongos patógenos del BMC

Los géneros de *Scopulariopsis* y *Curvularia* encontrados en los tratamientos de composta T3 y T2 representan ser patogénicos. Las especies de *Scopulariopsis* spp. han sido reportadas en pacientes inmunocomprometidos causando enfermedades respiratorias y de la piel (Raper y Thom, 1968). La presencia de este hongo en el BMC está asociada al periodo de almacenamiento en el que el sustrato se encuentra expuesto a las condiciones ambientales. El género de *Curvularia* ha sido reportado como fitopatógeno de gramíneas en particular la especie de *C. lunata* en los cultivos de arroz (Basha y Ulaganathan, 2002). La presencia de este hongo en el BMC puede ser explicada por el material vegetal y residuos de poda que se añaden a la composta. El efecto de patogenicidad de *Curvularia* es suprimido por la presencia de *Bacillus* en el BMC. *Bacillus* sp. es un agente controlador de *Curvularia* spp. por la producción de proteínas que provocan lisis en micelio del hongo (Basha y Ulaganathan, 2002).

2.4.3 Hongos encontrados en la turba

En la turba (Pro-Moss TBK®) se identificaron varios géneros de hongos comunes de suelo y en sustratos en almacenamiento. Los géneros de hongos identificados fueron: *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis* y *Trichoderma*. Este hallazgo coincide con los encontrados luego de analizar la microflora de la turba en distintas etapas de maduración (Airaksinen et al., 2005). Los estudios reportaron que según la madurez de la turba las poblaciones de estos microorganismos aumentan. Se ha reportado la presencia de *Aspergillus fumigatus* y *Trichoderma* spp. en turba con más tiempo de maduración, mientras que *Penicillium* spp. aparece asociado a la turba joven (Airaksinen et al., 2005).

En esta investigación las colonias de *Paecilomyces* spp. crecieron a temperaturas de 45 °C, mientras que se observó crecimiento de *Aspergillus* spp. tanto en 28 °C como en 45 °C. El proceso de calentar la turba, favorece el crecimiento de hongos termofílicos como *Aspergillus fumigatus* y *Paecilomyces* spp. (Airaksinen et al.,

2005). *Aspergillus fumigatus* y *Paecilomyces variotii* toleran temperaturas sobre los 55° (Millner et al., 1977 y Raper y Thom, 1968). La presencia de estos hongos termotolerantes puede ser causada por el proceso de secado que recibe la turba el cual no alcanza las temperaturas de esterilización o pasteurización necesarios para eliminar estos patógenos o bien por los microorganismos que se encuentran presentes en el ambiente de las plantas de procesamiento (Meriaux et al., 2006). Estudios previos han reportado la presencia de *A. fumigatus* en tiestos conteniendo medios de cultivo comerciales a base de turba y en plantas crecidas en condiciones de invernadero (Millner et al., 1977).

Un gran número de hongos termofílicos representan especies que pueden ser nocivas al ser humano y a los animales (Millner et al., 1977). *Aspergillus fumigatus* ha sido reportado como patógeno y nocivo al humano especialmente en pacientes inmunocomprometidos (Millner et al., 1997). Este es comúnmente aislado de aspergilomas causando enfermedades respiratorias. También se caracteriza por producción de micotoxinas en granos almacenados (Klich, 2002). Otro hongo reportado con características similares al *A. fumigatus* es *Paecilomyces variotii*, este es causante de micosis en el sistema respiratorio (Houbraken et al., 2010). También, ha sido identificado como causante de alergias cutáneas (Raper y Thom, 1968). En aspectos agrícolas se describe como promotor de crecimiento del sistema radical en plantas como las leguminosas y antagonista de *M. phaseolina* (Muhammad et al., 2010).

En el tratamiento con turba el hongo con el mayor número de aislados fue *Trichoderma* spp. seguido por *Aspergillus fumigatus*, encontrándose ambos en todas las diluciones. *Trichoderma* es conocido como antagonista y promotor de crecimiento en plantas. En este estudio se identificó la especie de *T. harzianum*. Este hongo actúa como hiperparásito y por la producción de metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas contra los patógenos del suelo, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium* (Ezziyyani et al., 2004)

Se identificaron dos aislados de *Scopulariosis spp.* en el tratamiento T5, presentando coloración y apariencia distinta en la colonia (Raper y Thom, 1968, Fig. 2. 20.1). Este hallazgo compara con lo encontrado en el T3, donde fue identificado el género *Scopulariosis spp.*, confirmando así la relación entre la presencia de ciertos hongos con el tiempo de maduración del sustrato y almacenaje.

2.4.4 Caracterización de Especies

En los tratamientos de BMC (T1 al T4) y turba (T5) analizados en este estudio se caracterizaron un total de 21 especies de los géneros identificados (Tabla 2.2).

Tabla. 2.2 Cantidad de colonias de hongos identificados en los tratamientos de Biosólido Municipal Compostado (BMC) y turba						
Especies de hongos	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T5²
<i>A. caespitosus</i>	7	8	-	-	-	-
<i>A. candidus</i>	3	-	-	-	-	-
<i>A. flavus</i>	1	-	-	-	-	-
<i>A. fumigatus</i>	-	-	-	-	4	16
<i>Aspergillus spp. M</i>	-	2	-	-	-	-
<i>Conidiobolus heterospus</i>	2	-	-	-	-	-
<i>Curvularia lunata</i>	-	1	-	-	-	-
<i>Mucor mucedo</i>	-	1	2	-	-	-
<i>Paecilomyces varioti</i>	-	-	-	-	-	12
<i>Penicillium citreonigrum</i>	2	6	23	36	-	-
<i>Penicillium citrinum</i>	-	-	1	-	-	-
<i>Penicillium implicatum</i>	-	3	-	-	-	-
<i>Penicillium spp. A</i>	-	2	-	-	-	-
<i>Penicillium spp. F</i>	8	8	-	-	-	-
<i>Pennicillium spp. G</i>	2	1	-	-	-	-
<i>Penicillium spp. H</i>	2	1	-	-	-	-
<i>Penicillium spp. N</i>	2	1	-	-	-	-
<i>Penicillium spp. O</i>	-	-	1	-	-	-
<i>Rhizopus spp.</i>	3	-	-	-	-	-
<i>Scopulariopsis</i>	-	-	1	-	2	-
<i>Trichoderma harzianum</i>	-	-	-	-	22	-

¹ Tratamientos T1, T2, T3, y T4 (BMC) T5 100% turba

² Crecidos a 45° C

-- 0 colonias

2.4.5 Caracterización de hongos del BMC y la turba

Aspergillus caespitosus Raper and Thom
Subgenus *Nidulantes* Section *Versicolores*

En CYA 25 las colonias fueron de color verde con el borde blanco, de forma ondulada irregular. El diámetro de la colonia es de 10- 15 mm (Fig 2.1 A) El reverso es color crema a amarillo pálido con el centro verde oliva oscuro. En CYA 37 las colonias fueron verdes oliva en el centro, con bordes color blanco en forma de anillo. Presentan pliegues poco definidos. El diámetro fue de 5-8 mm (Fig 2.1 B) El reverso es marrón oscuro. En MEA el color de las colonias fue blanco hacia los bordes y el centro con verde y tonalidades de anaranjado alrededor (Fig. 2.1 C) El diámetro de la colonia es mayor que en los otros medios con unos 12 mm. El reverso es crema a amarillo pálido con el centro verde oliva oscuro.

Conidióforo piriforme a espatulado, biseriado. Los fialidos son de 6 a 9 μm , las conidias globosas de 3.5 a 4.5 μm color marrón a ámbar algunas incoloras (Fig 2.1.1 A y B) (Klich, 2002).

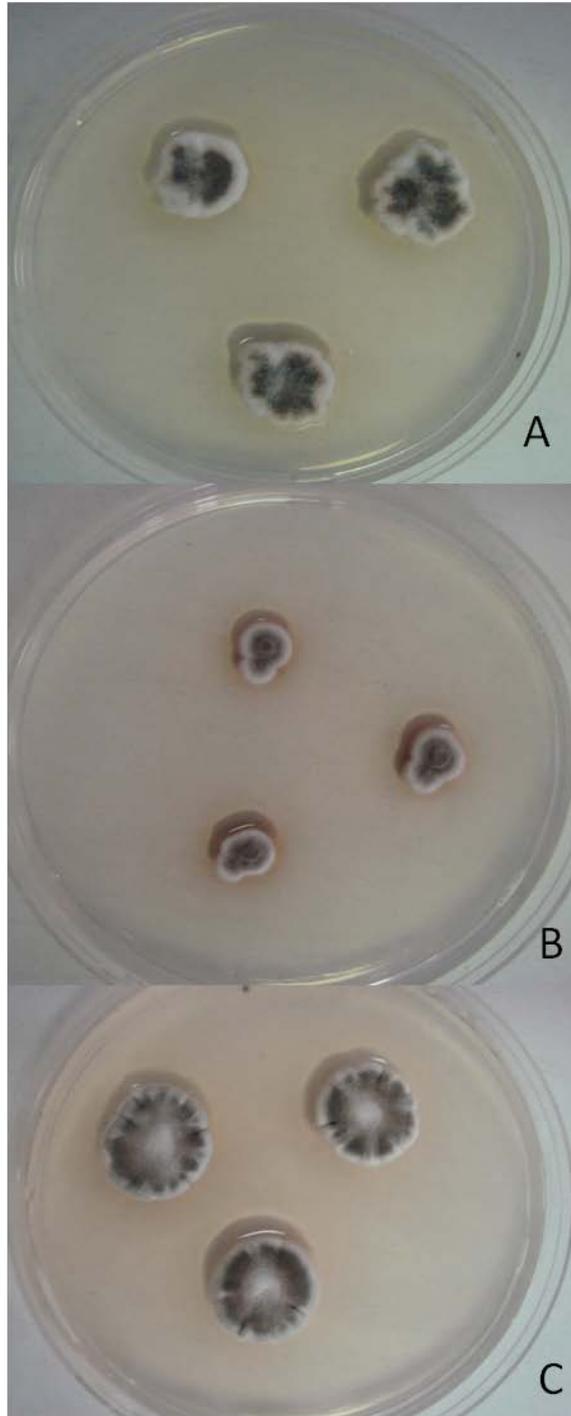


Figura. 2.1 *Aspergillus caespitosus*
A. Colonias en CYA 25 B. Colonias en
CYA 37 C. Colonias en MEA

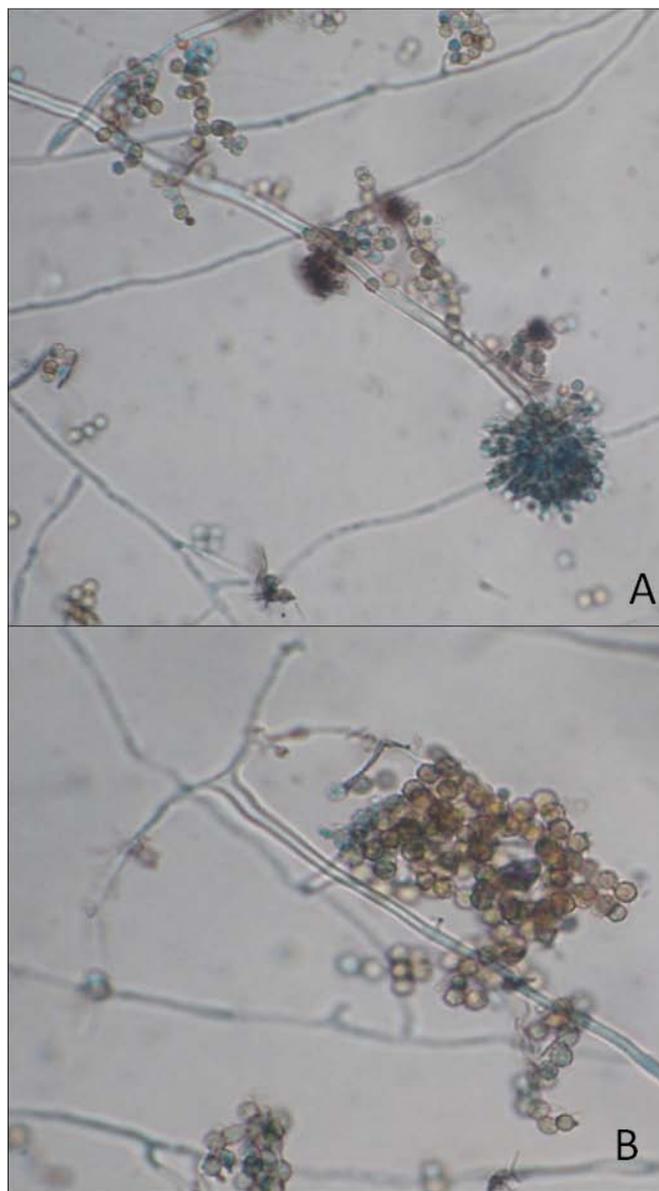


Figura. 2.1.2. *Aspergillus caespitosus*
A. Conidióforo. B. Conidias C. Pie basal,
40 x.

A. candidus Link

Subgénero Circumdati Sección: Candidi

En CYA 25 las colonias eran color blanco con centro amarillo donde se observó esporulación color amarilla. El reverso era amarillo con el borde más claro y diámetro de 17.5 mm (Fig. 2.2 A y B). En CYA 37 las colonias eran de color blanco con pliegues, el reverso amarillo pálido y con un diámetro de 16 mm. En CYA 20S las colonias eran color blanco con apariencia algodonosa, el reverso amarillo oliva (2.5Y) y diámetro de 25 mm. En MEA las colonias de color blanco presentaban elevación y eran filamentosas, un diámetro de 10 mm y reverso marrón amarillo claro (Fig. 2.2 C y D).

Conidióforo biseriado con vesícula globosa de 110 μm y conidias lisas y suaves de 2-3 μm (Fig. 2.2 E y F) (Klich, 2002).

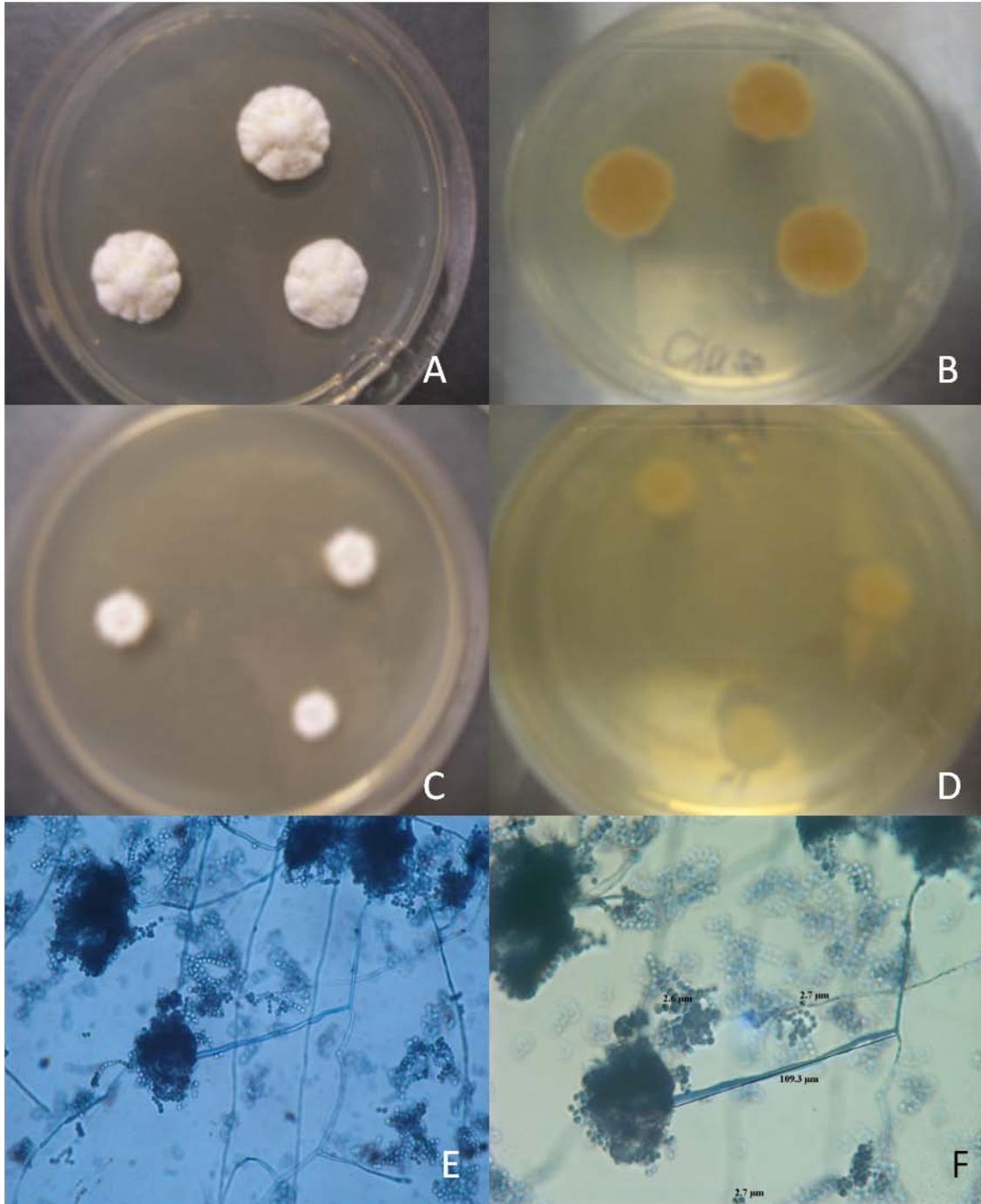


Figura. 2.2 *Aspergillus candidus* A Colonias en CYA 25. D. Reverso. C. Colonias en MEA. D. Reverso. E y F. Conidióforo biseriado , 40x

A. flavus Link

Subgénero *Circumdati* Sección *Flavi*

En CYA 25 las colonias presentaron un diámetro de 51 mm y de color amarillo pálido con esporas verdes, de apariencia arrugada y filamentosa. El reverso era amarillo pálido (*light yellow brown* 2.5Y) (Fig. 2.3 A y B). En CYA 37 las colonias presentaron diámetro de 65 mm, color verde con centro amarillo y el borde blanco. La apariencia era arrugada y se observaron esclerocios color marrón (Fig. 2.3. E) El reverso era amarillo pálido. En CYA 20S la colonia presentó un diámetro de 68 mm, color amarillo pálido de apariencia arrugada y esporulación verde con reverso amarillo (Fig. 2.3 F). En MEA las colonias eran color oliva con el centro más claro, el reverso color oliva pálido, eran planas y con un diámetro de 52 mm (Fig. 2.3 C y D).

Conidióforo biseriado de unos 445 μm de largo con vesículas globosas o piriformes y conidias pequeñas de 1-2 μm y color verde amarillo (Fig. 2.3.1) (Klich, 2002).

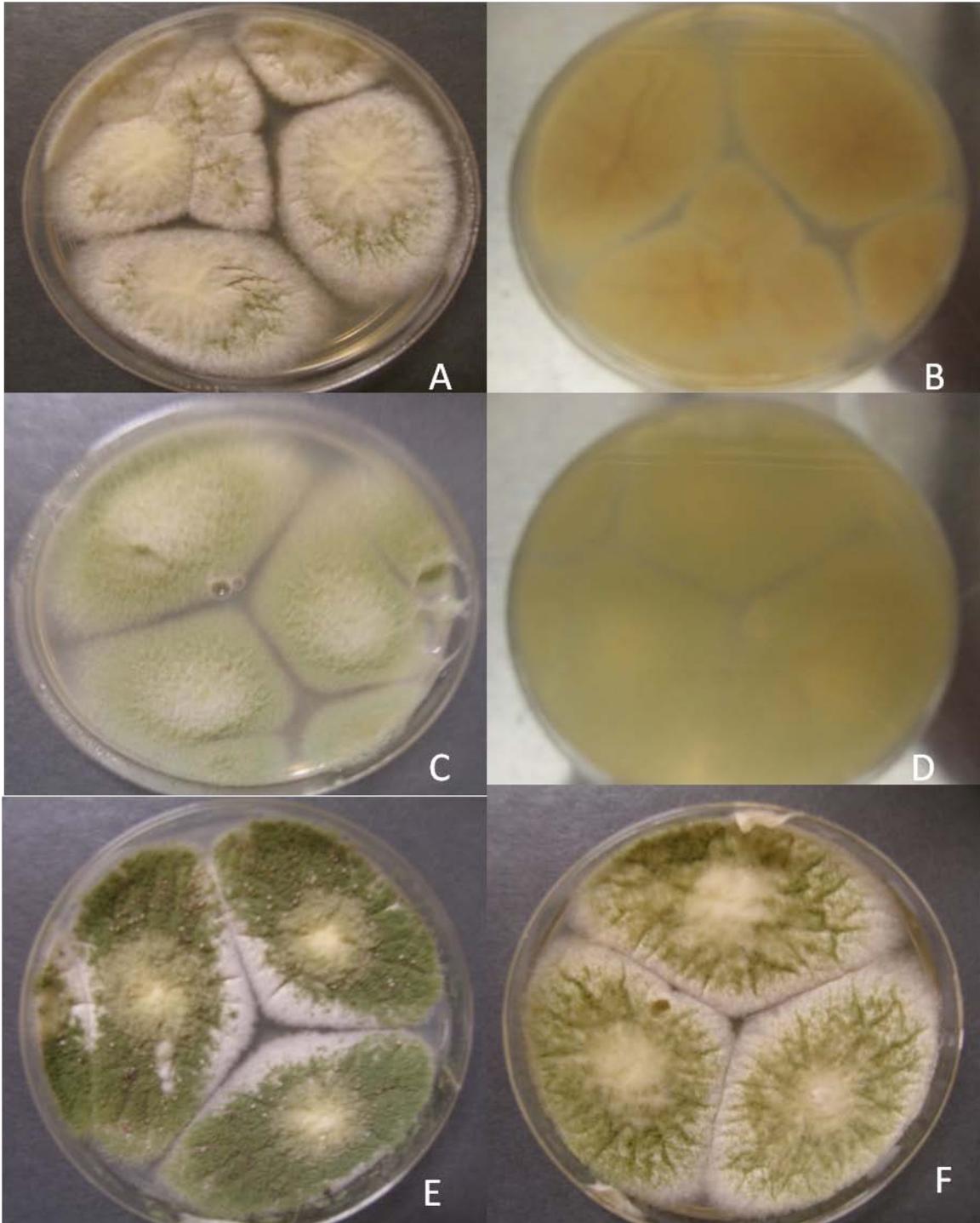


Figura. 2.3 *Aspergillus flavus* A. Colonias en CYA 25. B. Reverso . C. Colonias en MEA. D. Reverso. E. Colonias en CYA 37. F Colonias en CYA 20S.

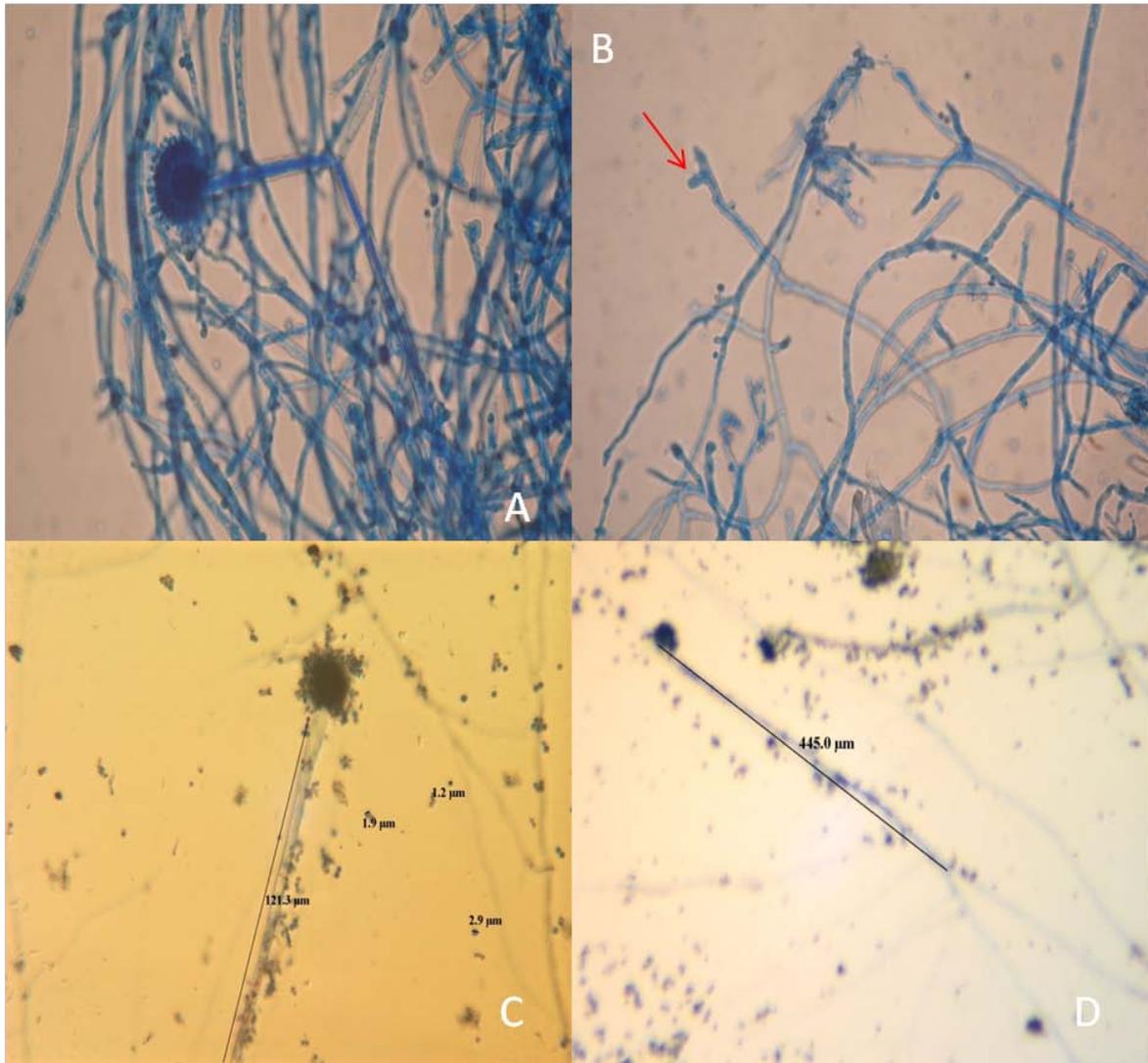


Figura. 2.3.1 A y C Conidióforo de *Aspergillus flavus* en 40x
 D. Conidióforo y pie basal en 10X. B. Pie basal.

Aspergillus fumigatus Fresen

Subgenus: Fumigati Section: Fumigati

En CYA 25 las colonias se observan color verde oliva con un centro definido color blanco y bordes difusos verde pálido. La apariencia es polvorienta con un crecimiento liso. El diámetro de la colonia fue de 52 a 60 mm. El reverso fue de color oliva oscura con centro amarillo pálido. (Fig. 2.4 A). En CYA 37 las colonias son similares a CYA 25 con una tonalidad de verde entre gris y marrón, tienen un mayor crecimiento de 60 a 70 mm. En MEA el diámetro de la colonia es de 55 a 60 mm la coloración de la colonia es similar a CYA 25, en cambio el reverso se observa amarillo.

El conidióforo es largo de unos 206 μm , uniserado con vesícula globosa a piriforme de 15 a 30 μm . Las conidias en CYA 25 son de color greyish a incoloras algunas con tonalidades turquesa, de pared lisa de unos 2 a 3 μm de diámetro (Fig. 2.4 C).

La especie es considerada patógeno a los humanos y animales. Produce las micotoxinas gliotoxin, verrucologen y fumitremorgin A y B (Klich, 2002)

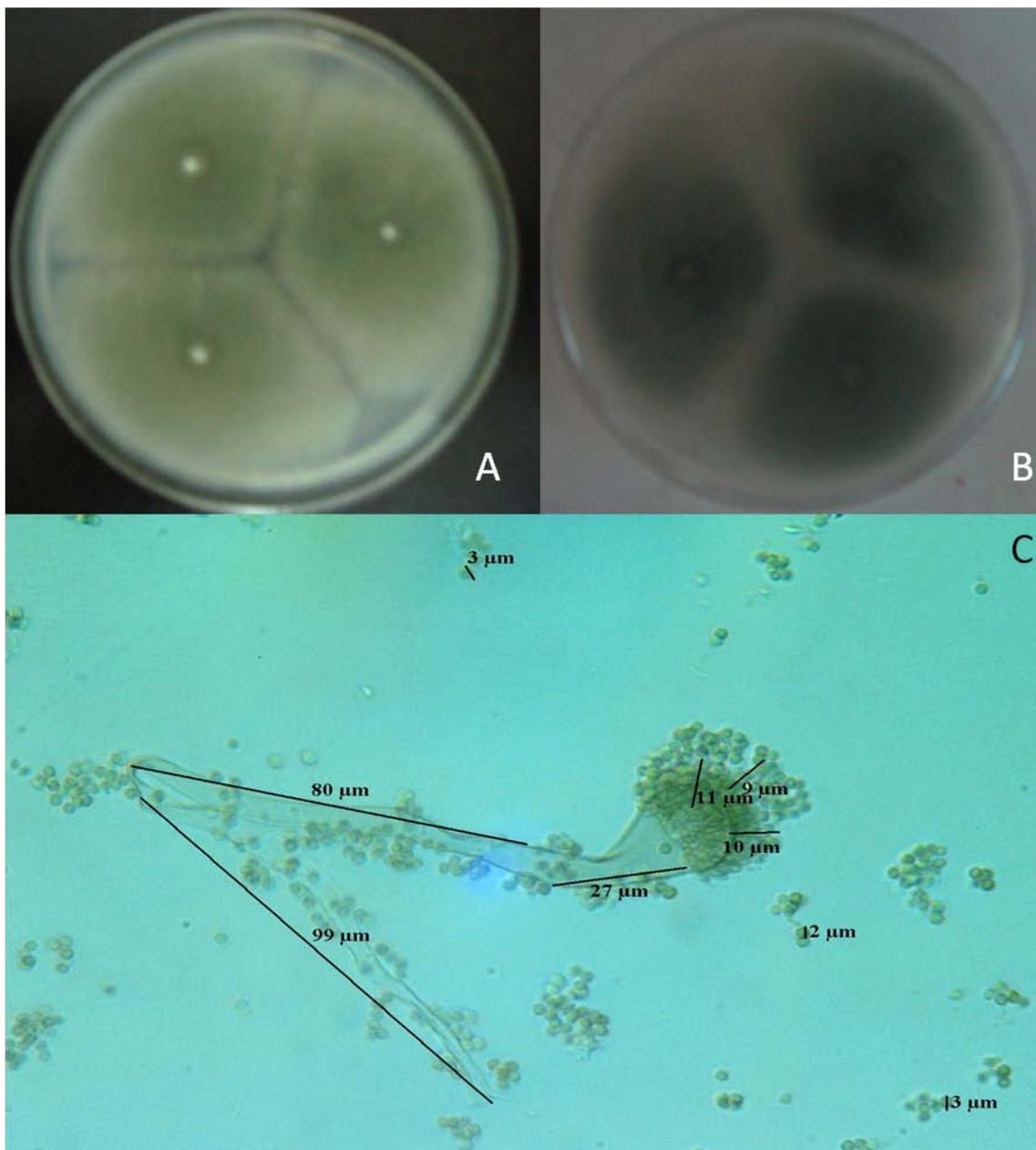


Figura. 2.4 *Aspergillus fumigatus* A. Crecimiento en CYA 25, B. Reverso CYA 25. C. Conidióforo en 40 x.

Aspergillus spp. M

Subgénero Circumdanti Sección Cremei

En CYA 25 la colonia era color marrón rojizo con tonalidad gris (*reddish gray, 7.5R*), los bordes crema y el reverso amarillo pálido. Presentaron diámetro de 20 mm, esporulación oscura y elevación al centro (Fig. 2.5 A y B). En CYA 37 las colonias tuvieron poco crecimiento, con un diámetro de 5 mm, eran de color blanco y apariencia arrugada y el reverso amarillo pálido. En CYA 20S las colonias eran blancas con elevación en el centro, el reverso color amarillo y diámetro 22 mm (Fig. 2.5 E y F). En MEA las colonias eran color blanco casi transparentes de apariencia porosa y planas con el reverso amarillo pálido y un diámetro de 11 mm (Fig. 2.5 C y D).

Conidióforo biseriado, largo de 300 μm con vesícula globosa y conidias lisas y suaves de 3- 5 μm (Fig. 2.5 A y B).

Similar a *A. cremeus* (Kwon-Chung and Fennell), fase sexual *Chaetosartorya cremea* (Kwon-Chung and Fennell). También similar a *A. candidus* (Klich, 2002).

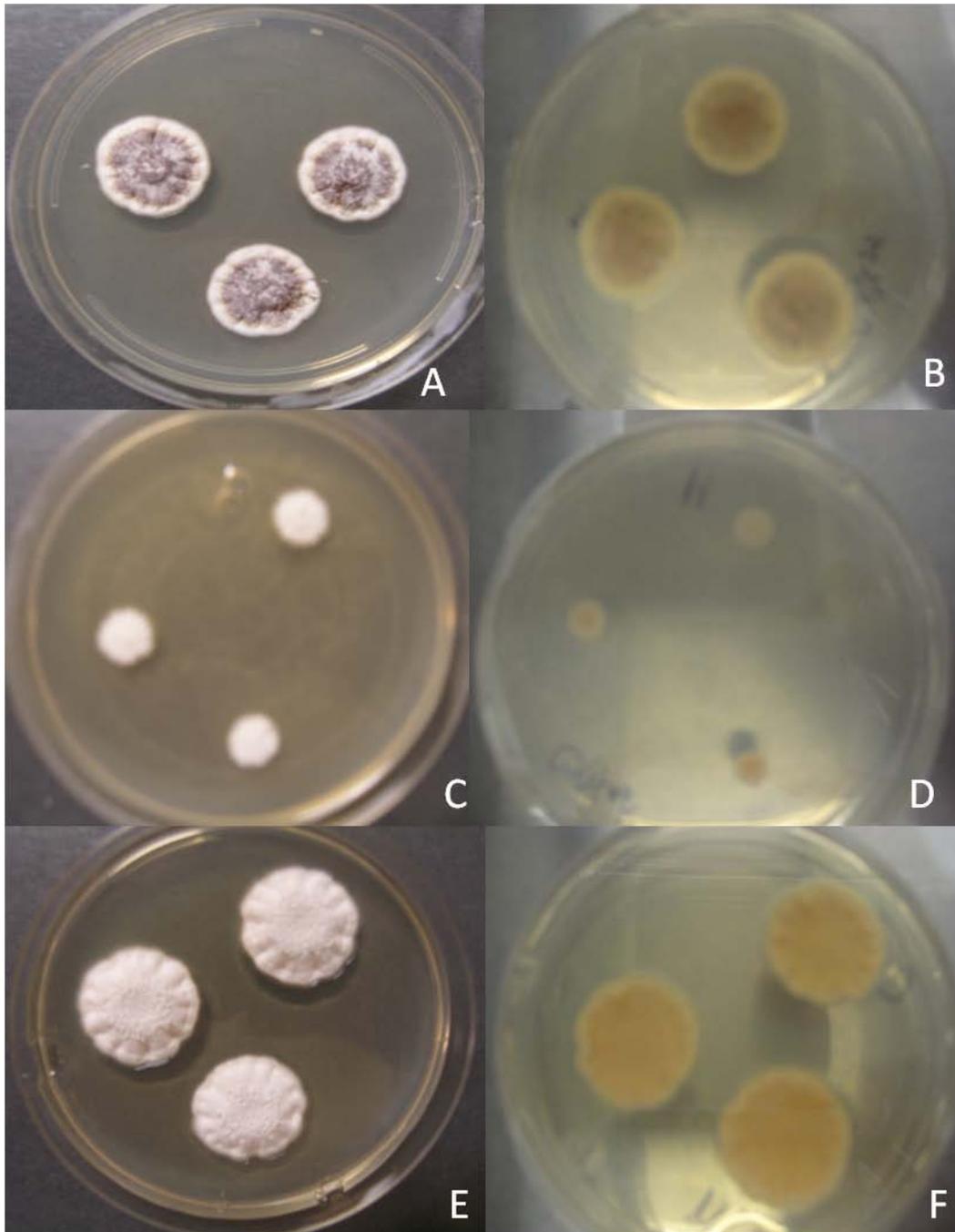


Figura 2.5 *Aspergillus* spp. A. Colonias en CYA 25 B. Reverso C. Colonias en MEA D. Reverso E. Colonias en CYA 20S F. Reverso

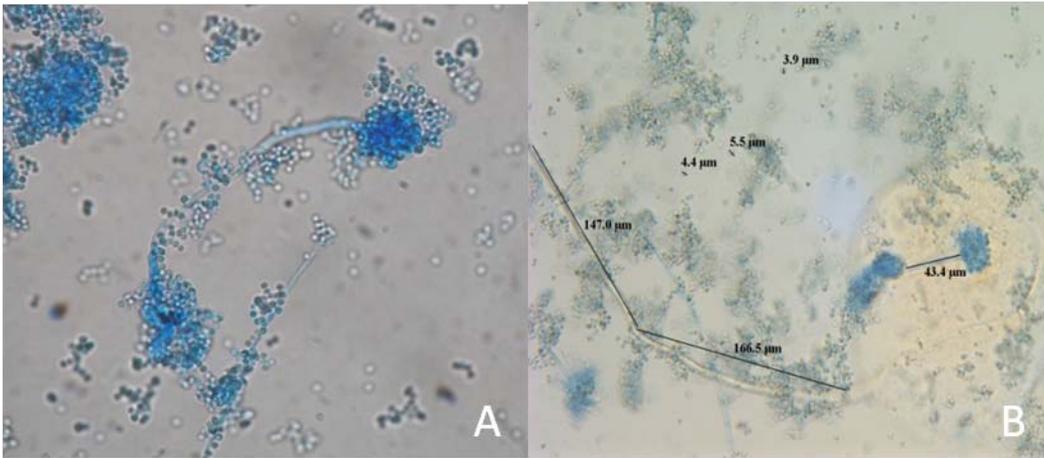


Figura 2.5.1 A y B. Conidióforo biseriado de *Aspergillus* spp., 40x y 10x

Conidiobolus heterosporus

Cigomiceto cuya colonia es de 3 cm en medio PDA, de color amarillo pálido de textura cerosa y apariencia cerebriforme (Fig 2.6 A) el reverso de color crema pálido. Conidias globosas incoloras. Esporangiólos secundarios o replicativos que salen de esporangiólos primarios (Fig. 2.6 B) (O'Donnell, 1979).

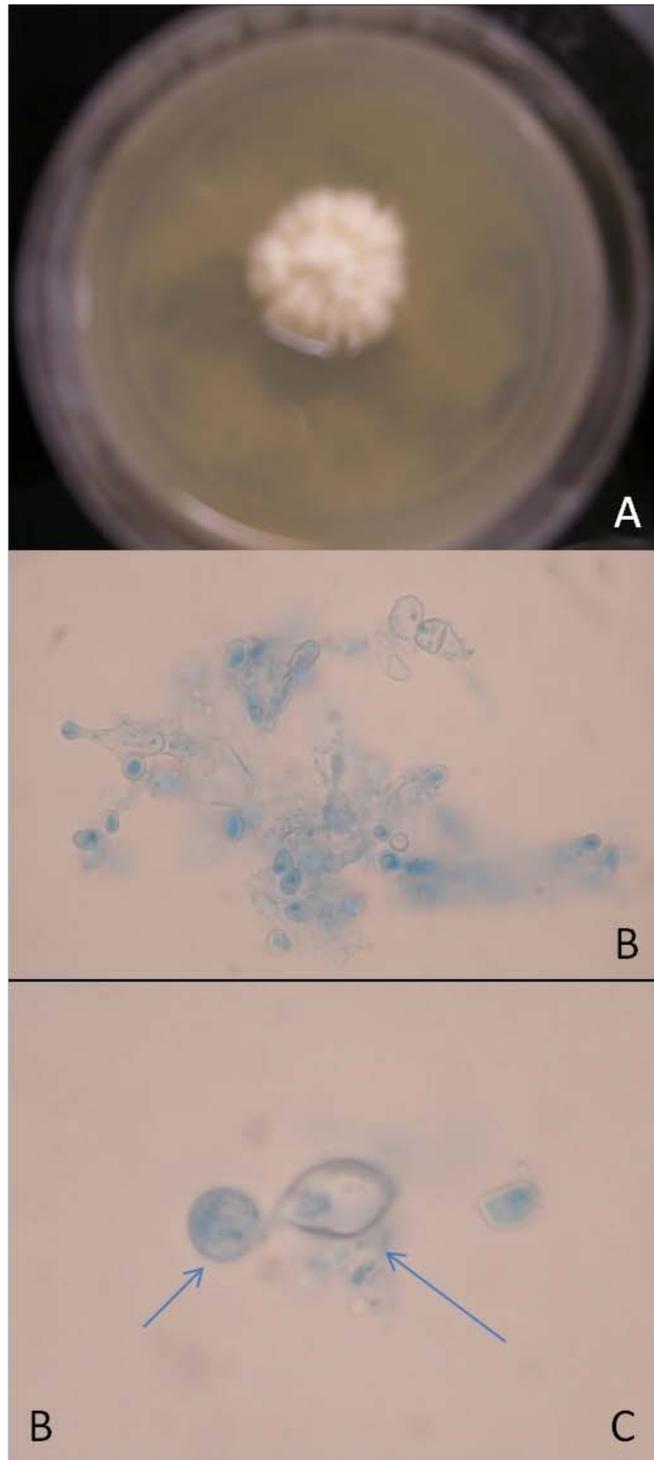


Figura. 2.6 A. Colonia de *Conidiobolus heterosporus* en PDA. B Esporangios secundarios C. Esporangios primario, 60 x.

Curvularia lunata (Wakker) Boedijn

Las colonias desarrollan un crecimiento denso de color marrón con tonalidades de gris a negro y apariencia de finos pelos (Fig 2.7 A). En ocasiones se observa un margen blanco alrededor de la colonia. El reverso es color marrón oscuro. El diámetro de la colonia puede alcanzar hasta unos 50 mm.

Los conidióforos surgen solitarios o en grupos, son de estructura geniculada septados y lisos de alrededor de 200 μm . Las conidias son rígidas o curvas de forma fusiforme a elipsoidal de 23 a 26 μm x 9-15 μm de diámetro, con 3 a 4 tabiques; la penúltima célula es asimétrica curvada y más oscura que las otras (Fig 2.7 B y C) (Sivanesan, 1987). *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn es patógena de la mayoría de las gramíneas en el trópico (Basha y Ulaganathan, 2002). La especie *Curvularia lunata* var. *aeria* (Bat., J.A. Lima y C.T. Vasconc.) M.B. Ellis ha sido reportada en Puerto Rico (Cantrell et al., 2006).

Similar a *C. affinis* se distinguen en que *C. affinis* que posee 4 a 5 tabiques en la conidia. *C. affinis* Boedijn ha sido reportado como patógeno de los cultivos *Oryza sativa* y *Zea* como de algunas dicotiledóneas (Basha y Ulaganathan, 2002).

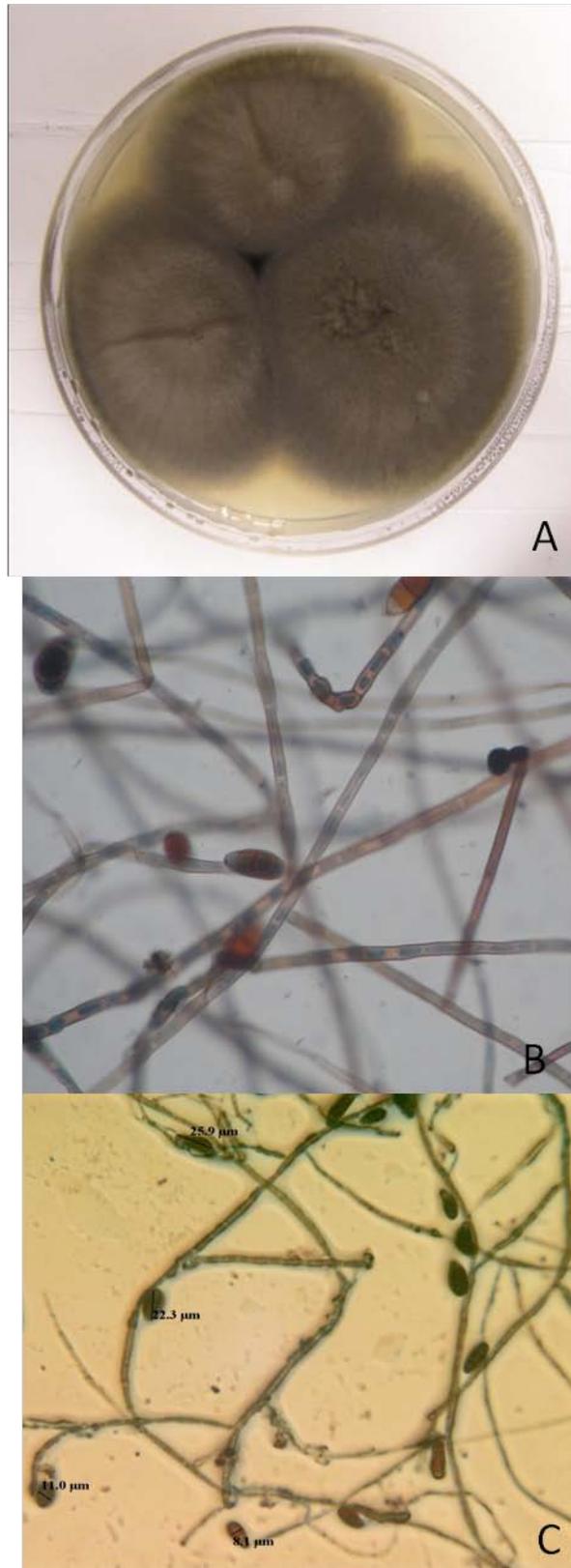


Figura 2.7 *Curvularia affinis*
A. Colonia en PDA B y C. Esporas, 40x

Mucor mucedo

Mucor (Micheli, 1729 Fries, Syst. Mycol 3: 317. 1832 non (Lichens)

Cigomiceto cuyo crecimiento de la colonia en medio PDA es abundante en unos 3 días, de color marrón olivo y apariencia filamentosa (Fig. 2.8 C). Esporangios globosos, esporangióforos simples y ramificados, homotático (Fig. 2.8 A).

Similar a la especie *M. hiemalis* Wehmer

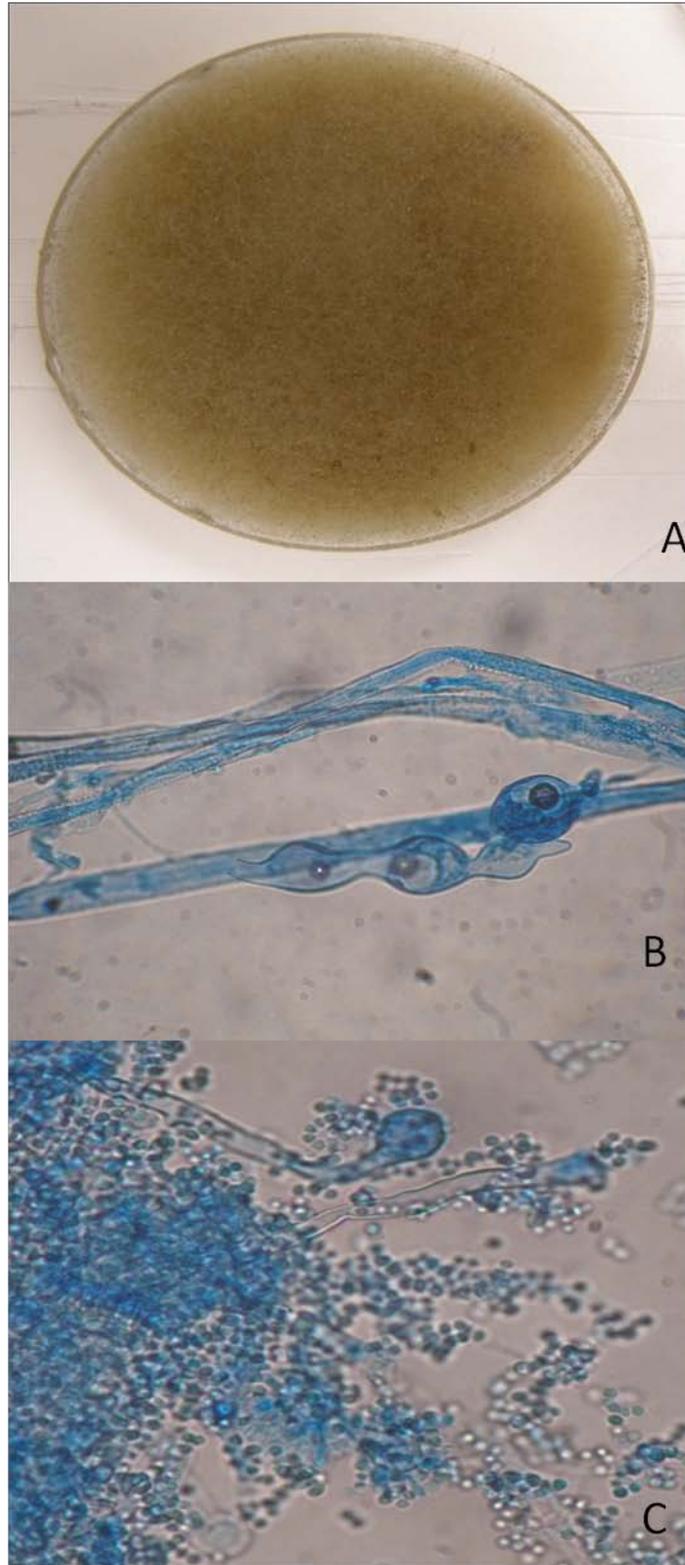


Figura 2. 8 A. Colonia de *Mucor mucedo* en PDA B y C. Esporangios, 60x

Paecilomyces varioti Bainier

En CYA 25 las colonias presentaron color amarillo a crema de apariencia filamentosa, ramificada, sin elevación, en el punto de inoculación hay elevación al centro. El diámetro de las colonias fue de 12- 15 mm. El reverso, color amarillo pálido mostrando ramificación en los bordes. En CYA 37 el color de las colonias fue igual a CYA 25, tornándose más densa, con apariencia algodonosa al centro. El diámetro fue de 26-28 mm (Fig 2.9 A y B). El reverso, color amarillo pálido, casi blanco con el punto de inoculación marrón. En CYA 5 no hay crecimiento.

Conidióforos mediano y densos de unos 73 μm . Posee filamentos de 7 a 8 μm de largo. Las conidias de pared lisa y forma elíptica o fusiforme son de color amarillo a ámbar en ocasiones hialinas de unos 2 a 3 μm de diámetro (Fig 2.9) (Raper y Thom, 1968).

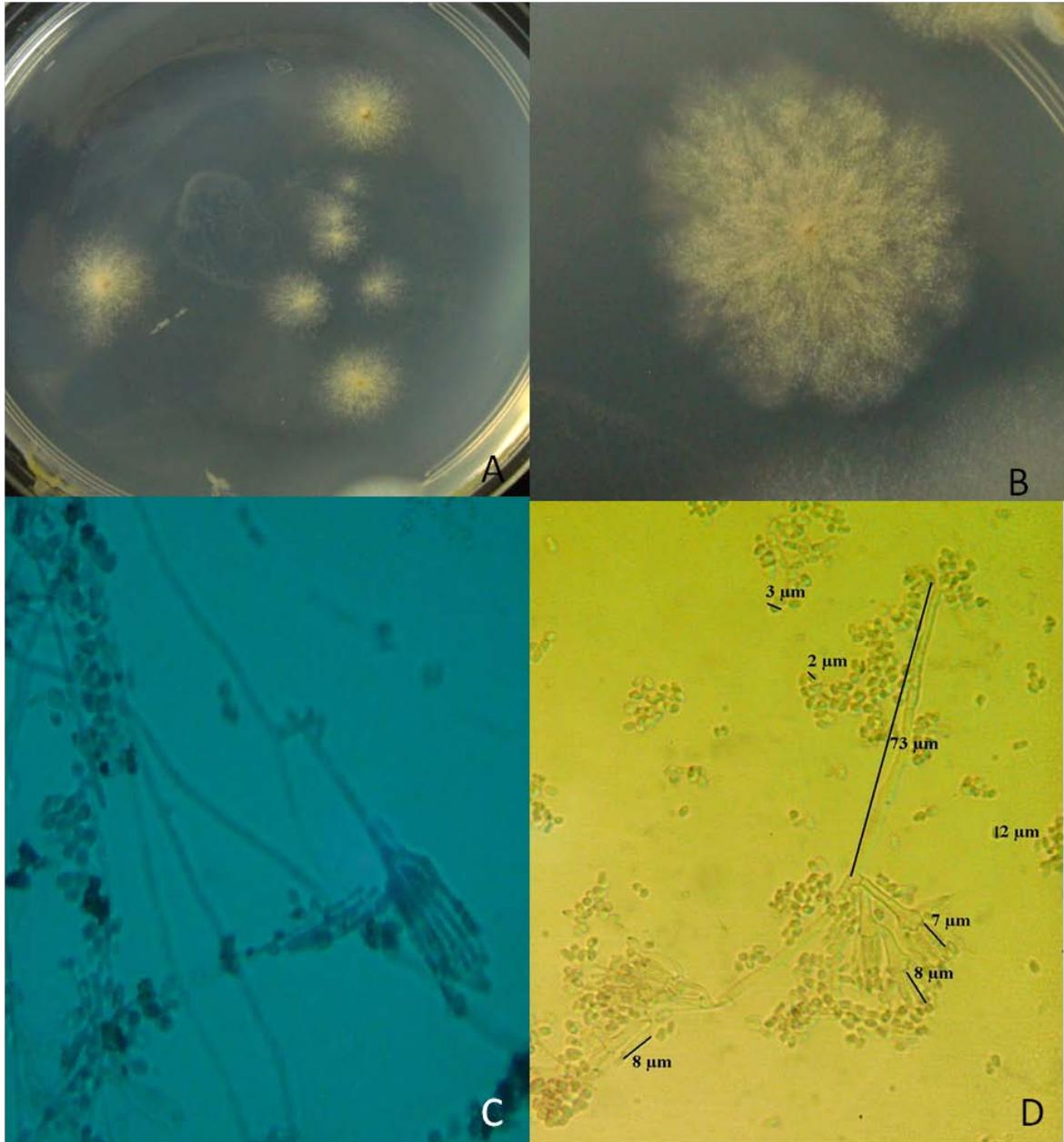


Figura 2. 9 *Paecilomyces varioti* A y B. Colonias en CYA 25. C y D. Conidióforo, 40x

P. citreonigrum Dierchx

Subgénero *Aspergilloides* Dierchx.

En CYA 25 las colonias fueron de unos 18 mm de diámetro color crema y reverso amarillo con elevación en el centro y pliegues (Fig. 2.10 A y B). En CYA 37 las colonias presentaron un diámetro de 15.5 mm y color crema con puntos color marrón en el centro, presentan exudado incoloro y borde difuso. El reverso fue amarillo pálido (2.5Y) con bordes oliva marrón (2.5Y) (Fig. 2.10 E y F). En MEA las colonias mostraron un crecimiento menor, de unos 10 mm, color crema con reverso marrón (*brownish yellow*, 10YR) y centro amarillo, el borde se observa polvoriento y difuso (Fig. 2.10 C y D). En G25N el diámetro de las colonias fue de 15 mm, color blanco con pliegues suaves y reversos amarillo pálido (Fig. 2.10 A y B).

Conidióforo pequeño de unos 15 μm , monoverticilado no vesiculado. Los son fiálidos separados de 8 μm y conidias lisas de 2.5 a 4 μm en arreglo de cadena (Fig. 2.10 C y D) (Pitt, 1985).

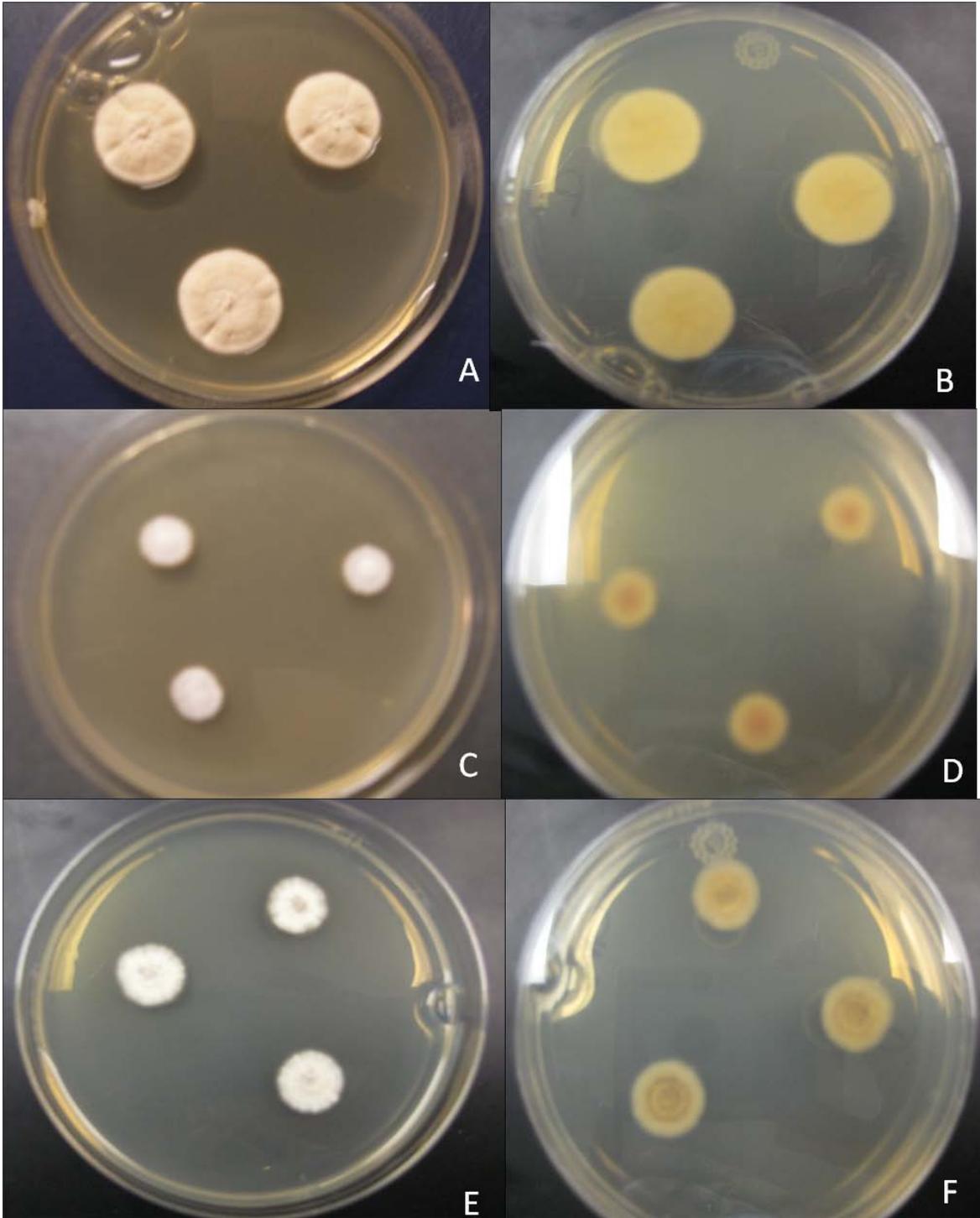


Figura. 2.10 *Penicillium citreonigrum* A. Colonias en CYA 25. B. Reverso . C.. Colonias en MEA. D. Reverso en MEA. E. Colonias en CYA 37.F. Reverso.

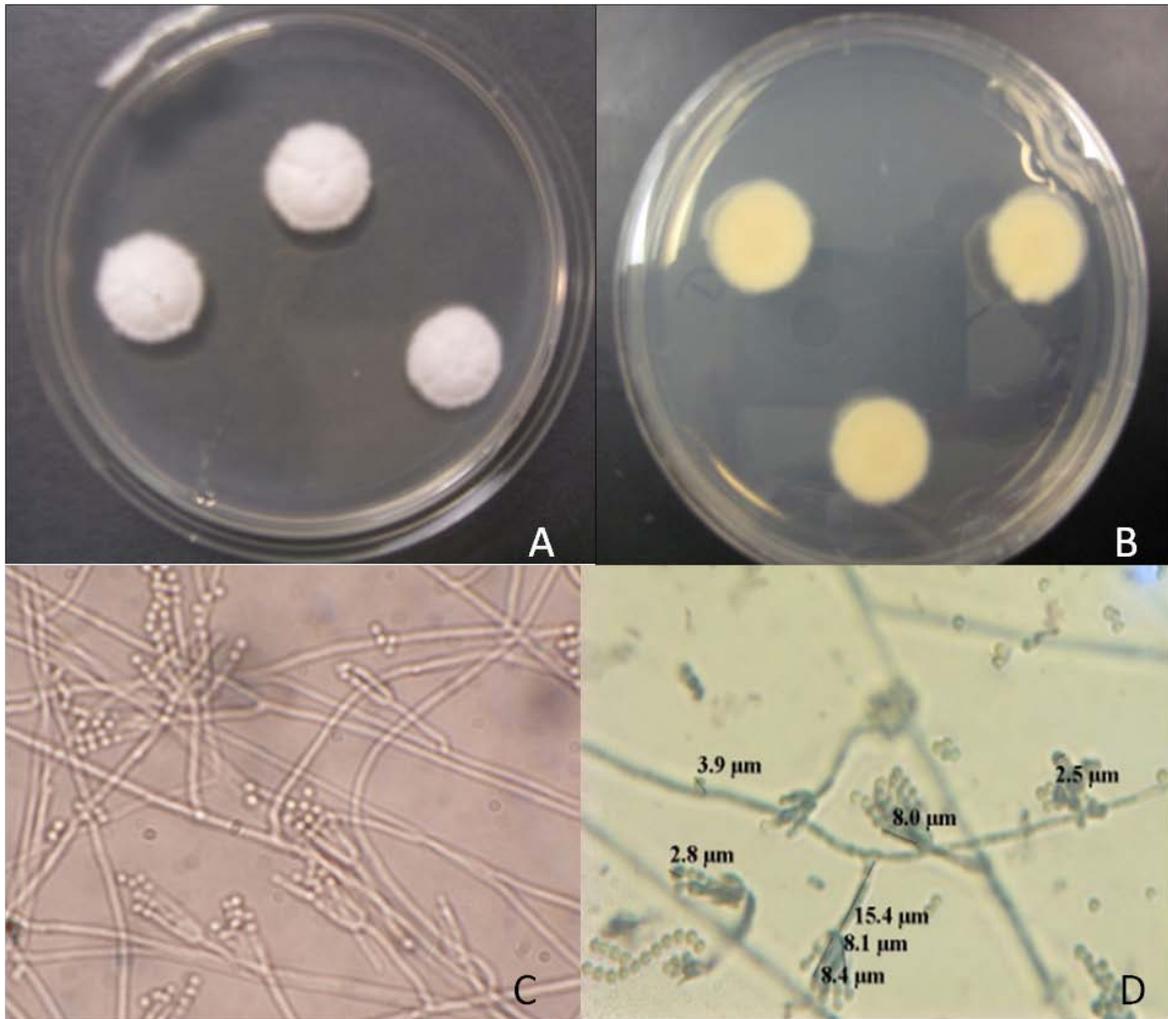


Figura. 2.10.1 *Penicillium citreonigrum* A. Colonias en G25N. B. Reverso en G25N. C y D. Conidióforo monoverticilado de *Penicillium*, 40x.

Penicillium citrinum Thom

Subgenus Furcatum

En CYA 25 las colonias presentaron color verde, con bordes blancos y reverso verde oliva pálido. El diámetro fue de unos 28 a 30 mm (Fig. 2.11 A). En CYA 5 las colonias eran color verde pálido con unos 9 mm de diámetro. En CYA 37 no ocurrió crecimiento. En MEA las colonias presentaron color crema verdoso a amarillo, con los bordes del mismo color en tono más claro, el centro verde oliva a marrón, con exudado incoloro brillante. El reverso amarillo intenso. El diámetro fue de 33 mm (Fig. 2.11 B). La especie muestra gran variación en color según el aislado (Pitt, 1985).

Conidióforo largo de unos 106 μm , biverticilado no veciculado. Los fiálidos se encuentran agrupados son de un largo de 6 micrómetros. Las conidias son esféricas y lisas, color verde a ámbar de 2 a 4 μm que surgen en cadenas definidas una por metula (Fig. 2.11 C y D) (Pitt, 1985).

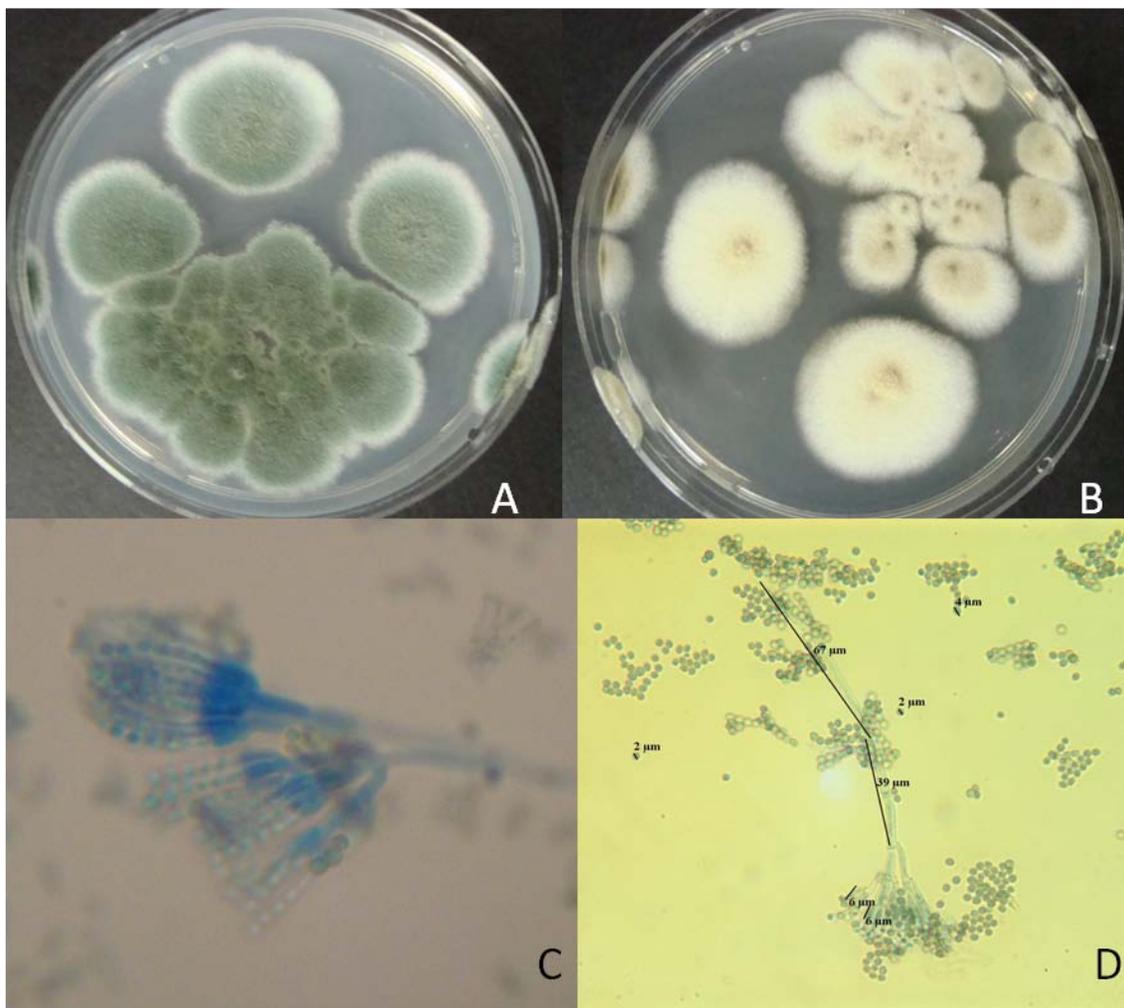


Figura. 2.11 *Penicillium citrinum* A. Colonias en CYA 25. B. Colonias en MEA. C y D. Conidióforo, 40x.

P. implicatum Biourge

Subgénero *Aspergilloides* Dierchx

En CYA 25 las colonias fueron de 27 mm de diámetro, color crema amarillo pálido (5Y *pale yellow*) pliegues y exudado incoloro y apariencia velutinosa. El reverso, amarillo (Fig. 2.12. A y B). En CYA 37 presentaron un menor diámetro de unos 13 mm, el color de la colonia es anaranjado en el centro y verde con tonalidad de gris (*gray light greenish gray*) bordes plegados y exudado y reverso amarillo (2.5Y) (Fig. 2.12 E y F). En MEA las colonias fueron verdes con el borde blanco y pliegues, de un diámetro de 21.5 mm y reverso amarillo a marrón con los bordes verdes (Fig. 2.12 C y D). En G25N las colonias fueron similares a CYA 25, sin exudado, diámetro de 20.5 mm y reverso amarillo presentando en el borde un tono más claro (FIG. 2.12 A y B).

El conidióforo es onoverticilado, ramificado y vesiculada. Posee conidióforo mediano de 72 μm . Fiálidos agrupados de 4-5 μm conectados a una vesícula. Conidias de 2-3 μm y pared lisa (Fig. 2.12.1 C y D) (Pitt,1985).

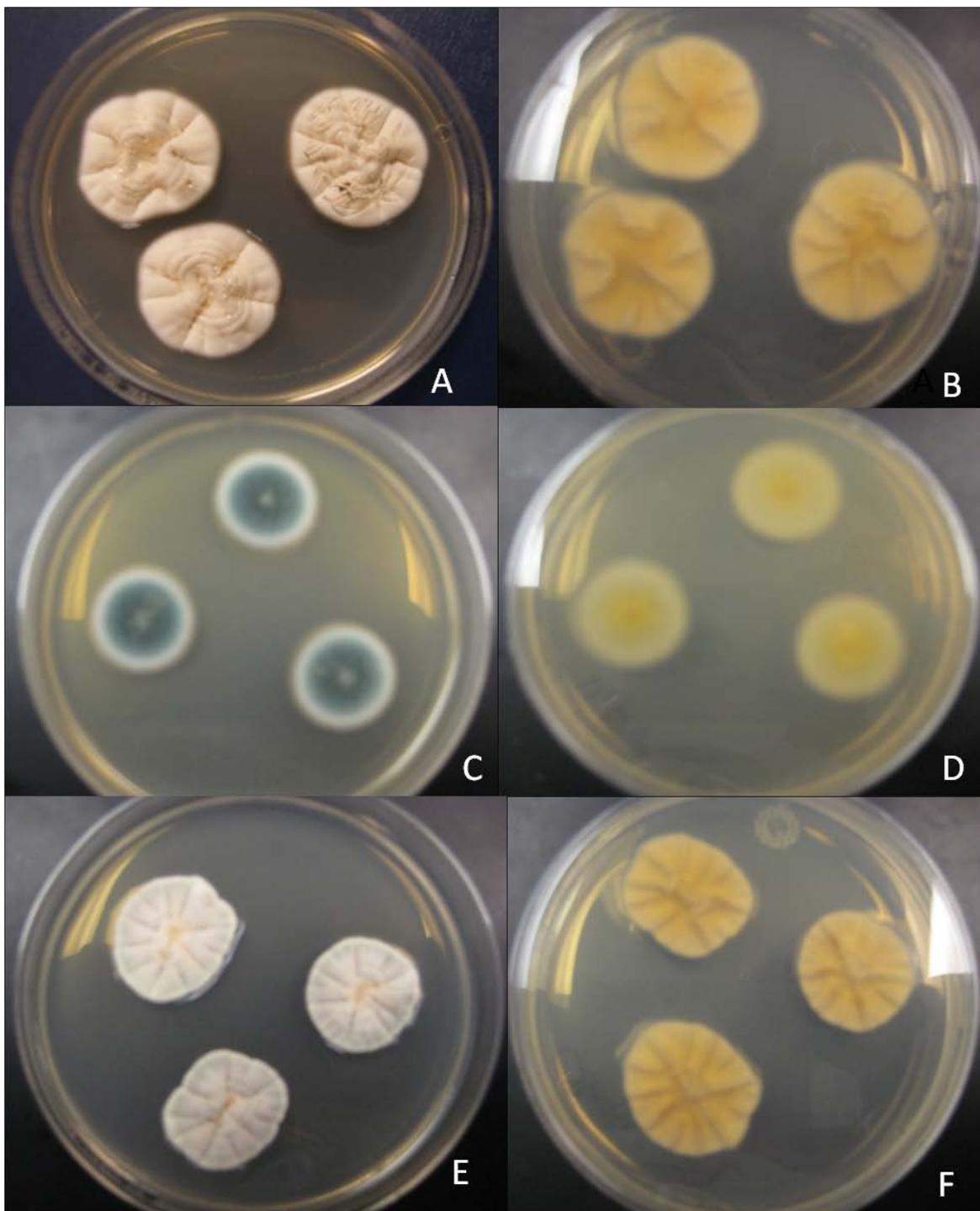


Figura. 2.12 *Penicillium implicatum* A. Colonias en CYA 25. B. Reverso . C. Colonias en MEA. D. Reverso. en MEA. E. Colonias en CYA 37. H. Reverso.

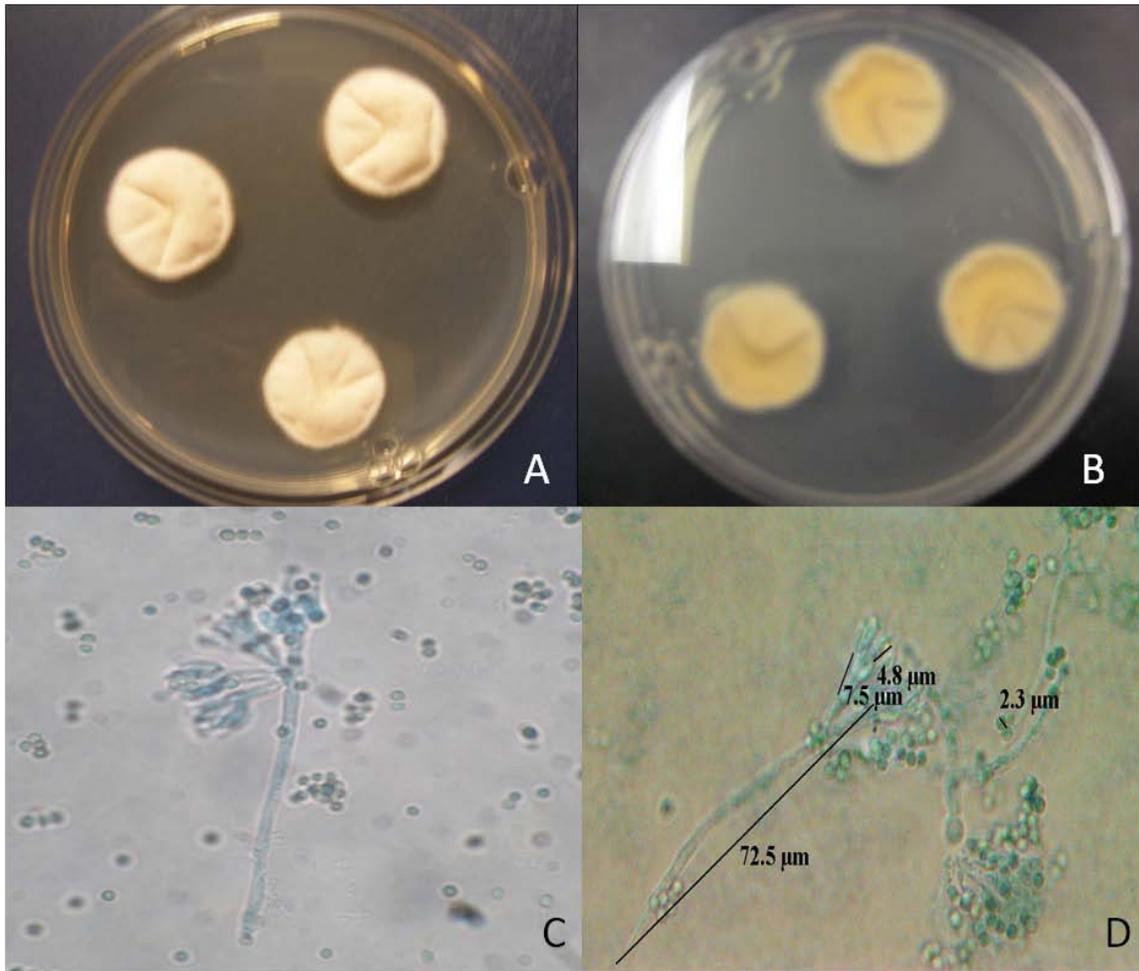


Figura. 2. 1.2.1 *Penicillium implicatum* A. Colonias en G25N. B. Reverso en G25N. C y D. Conidióforo vesiculado y ramificado de *P. implicatum*, 40x.

Penicillium spp. A

Subgénero *Aspergilloides* Dierchx.

En CYA 25 las colonias presentaron un diámetro de 33 mm de color anaranjado y borde verde pálido. Las colonias son de apariencia velutinosa, similar a una textura aterciopelada, con pliegues bien definidos y gotas grandes de exudado anaranjado. El reverso fue amarillo con el borde claro (Fig. 2.13 A y B). En CYA 37 las colonias mostraron color verde intenso y amarillo con un diámetro de 28 mm y mayor cantidad de pliegues que en medio CYA 25 (Fig. 2.13 E y F). En MEA las colonias son verdes con un borde fino color blanco el reverso es amarillo pálido, planas con un diámetro de 22 mm (Fig. 2.13 E y F). En G25N las colonias obtuvieron un diámetro de 27 mm y color blanco (10YR) con un borde fino alrededor del centro color verde. Se observan pliegues que le dan una apariencia arrugada. El reverso fue amarillo intenso como fluorescente (Fig. 2.13 A y B).

Conidioforo monoverticilado ramificado y no vesiculado de 110 μm con ramificaciones que se extienden de 6.5 a 8.5 μm de las que salen unos filios aglomerados de 5 a 7 μm . Las conidias son lisas y tienen un diámetro de 1.5 a 3 μm (Fig. 2.13 C y D). Similar a *P. citreonigrum* Dierchx. Se diferencia en que produce colonias verdes en CYA 25 y se desarrolla bien en CYA 37. Los conidióforos son ramificados (Pitt, 1985).

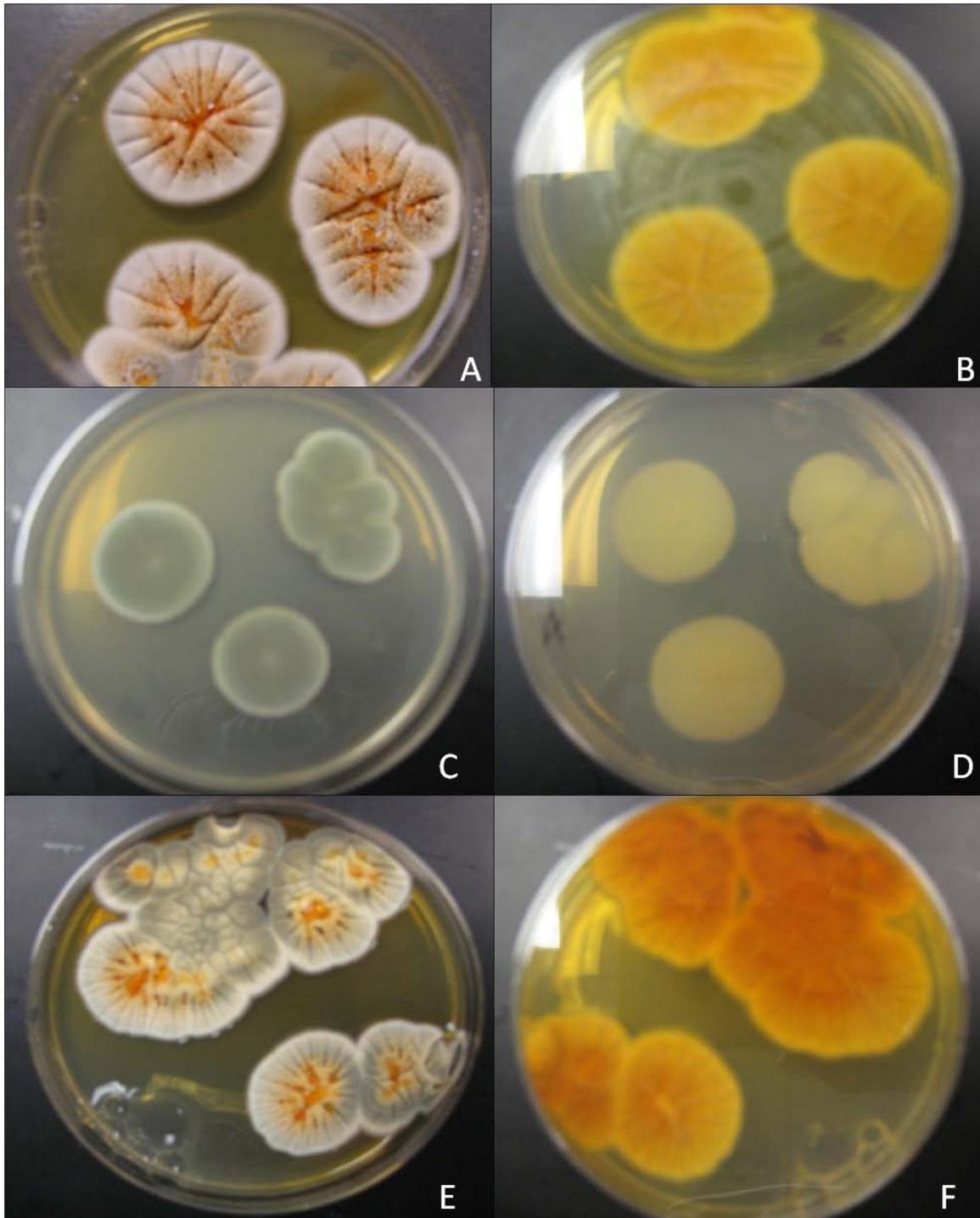


Figura 2.13 *Penicillium* spp. A. Colonias en CYA 25 B. Reverso C. Colonias en MEA D. Reverso en MEA E. Colonias en CYA 37 F. Reverso

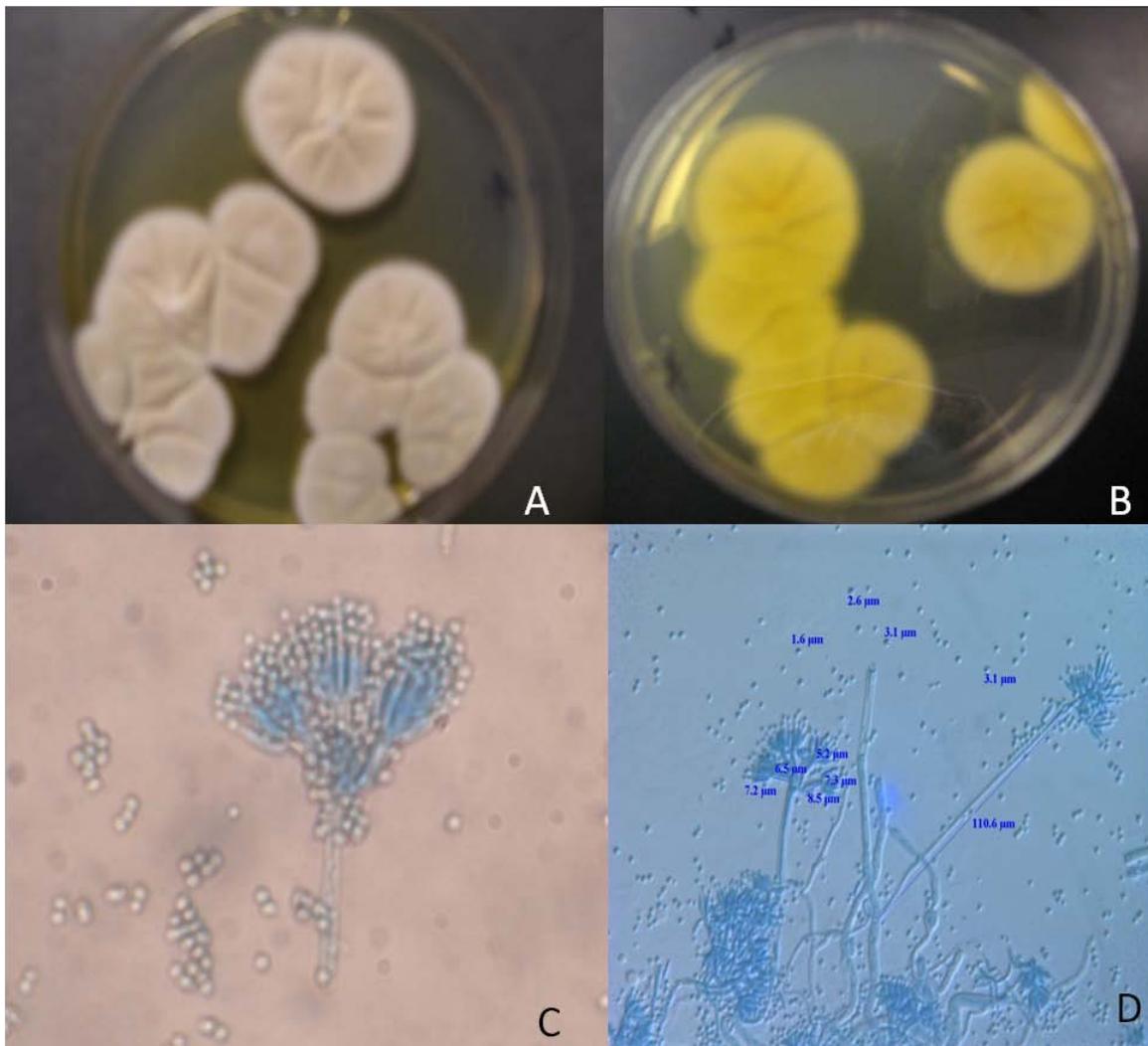


Figura 2.13.1 A. Colonias en G25N B. Reverso en G25N C y D. Conidióforo ramificado de *Penicillium* spp., 40x

Penicillium spp. F

Subgénero *Aspergilloides* Dierchx.

El crecimiento en CYA 25 fue de alrededor de 17 mm de diámetro. Las colonias presentaron color blanco formando pliegues y reverso color marrón (*yellow darkwish brown*) con los bordes de un tono más claro. No produjo exudado ni esporulación (Fig. 2.14 A y B). Creció en CYA 37 produciendo colonias de 22 mm de diámetro color blanco con pliegues y liberando exudado al medio. En el reverso se observó un color amarillo marrón (*yellowish brown*, 10YR) (Fig. 2.14 E y F). En MEA las colonias presentan un crecimiento menor, de unos 12 cm y color amarillo pálido con reverso marrón (*brownwish yellow*, 10YR) (Fig. 2.10 C y D). En G25N se observaron colonias pequeñas de 11 mm color blanco con borde difuso y reverso amarillo pálido.

El conidióforo es monoverticilado no vesiculado de unos 12 μm , fiálidos separados de 5 a 7 μm y conidias lisas de 1.5 a 2 μm en arreglo de cadena (Fig. 2.14 A y B). Se diferencia de *P. citreonigrum* Dierchx, en que tiene colonias de menor tamaño en CYA 25 y crece en CYA 37 unos 22 mm. Los colores de las colonias concuerdan con los descritos para *P. citreonigrum* Dierchx en los diferentes medios (Fig. 2.10. A y B) (Pitt, 1985).

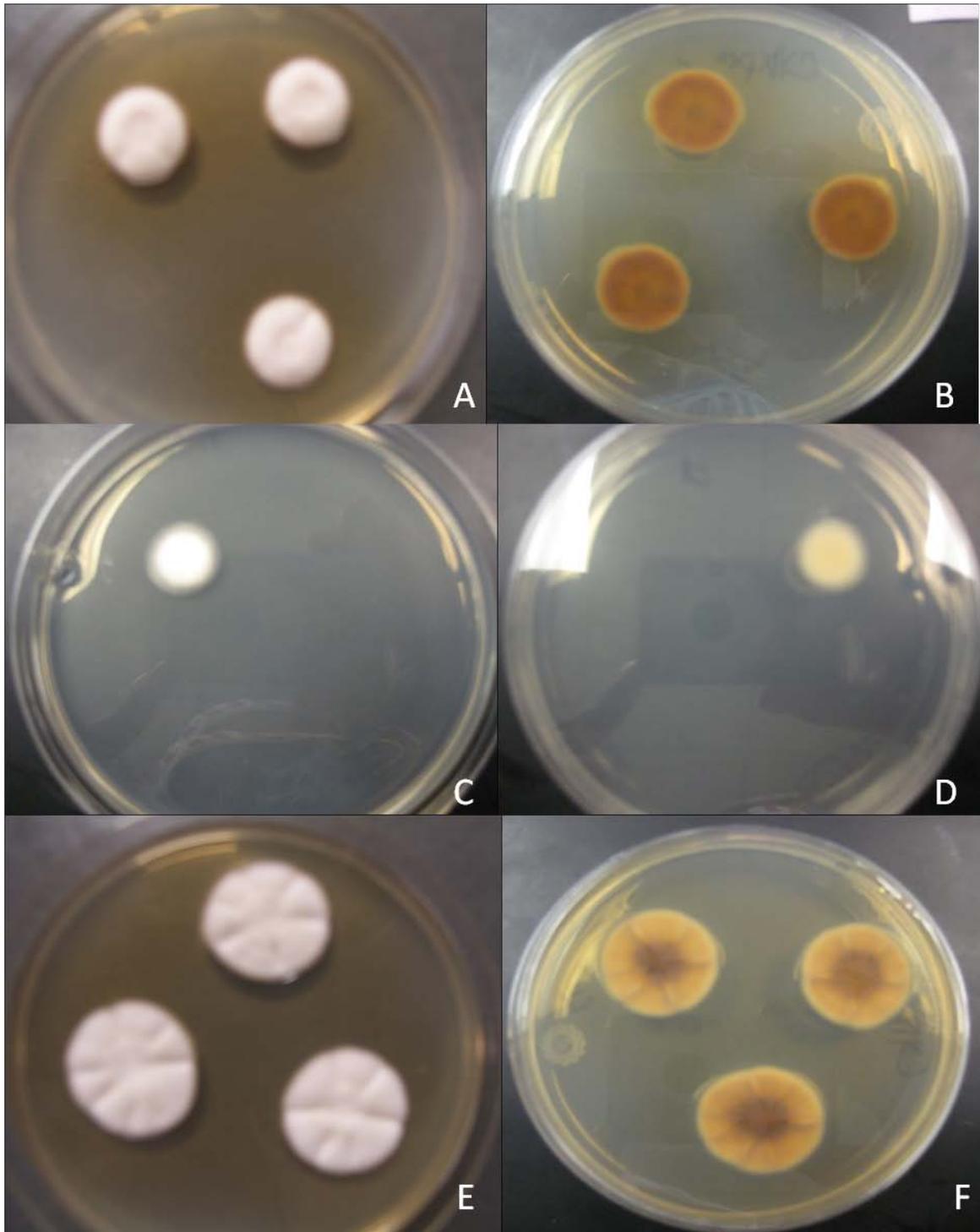


Figura 2. 14 *Penicillium* spp. (F) A. Colonias en CYA 25 B. Reverso C. Colonias en MEA D. Reverso en MEA E. Colonias en CYA 37 F. Reverso

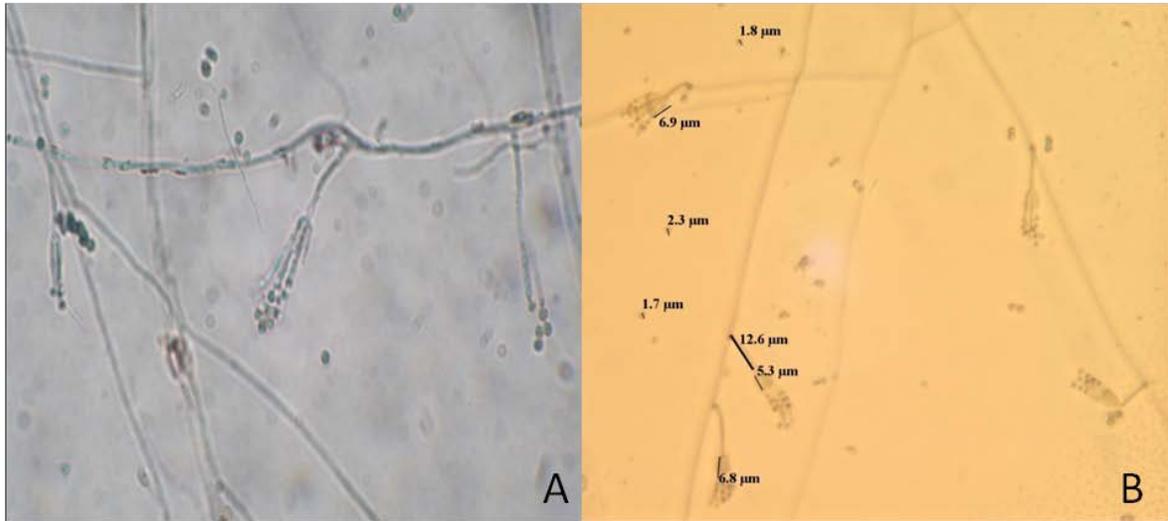


Figura 2.14.1 A y B. Conidióforo monoverticilado de *Penicillium* spp. (F), 40x.

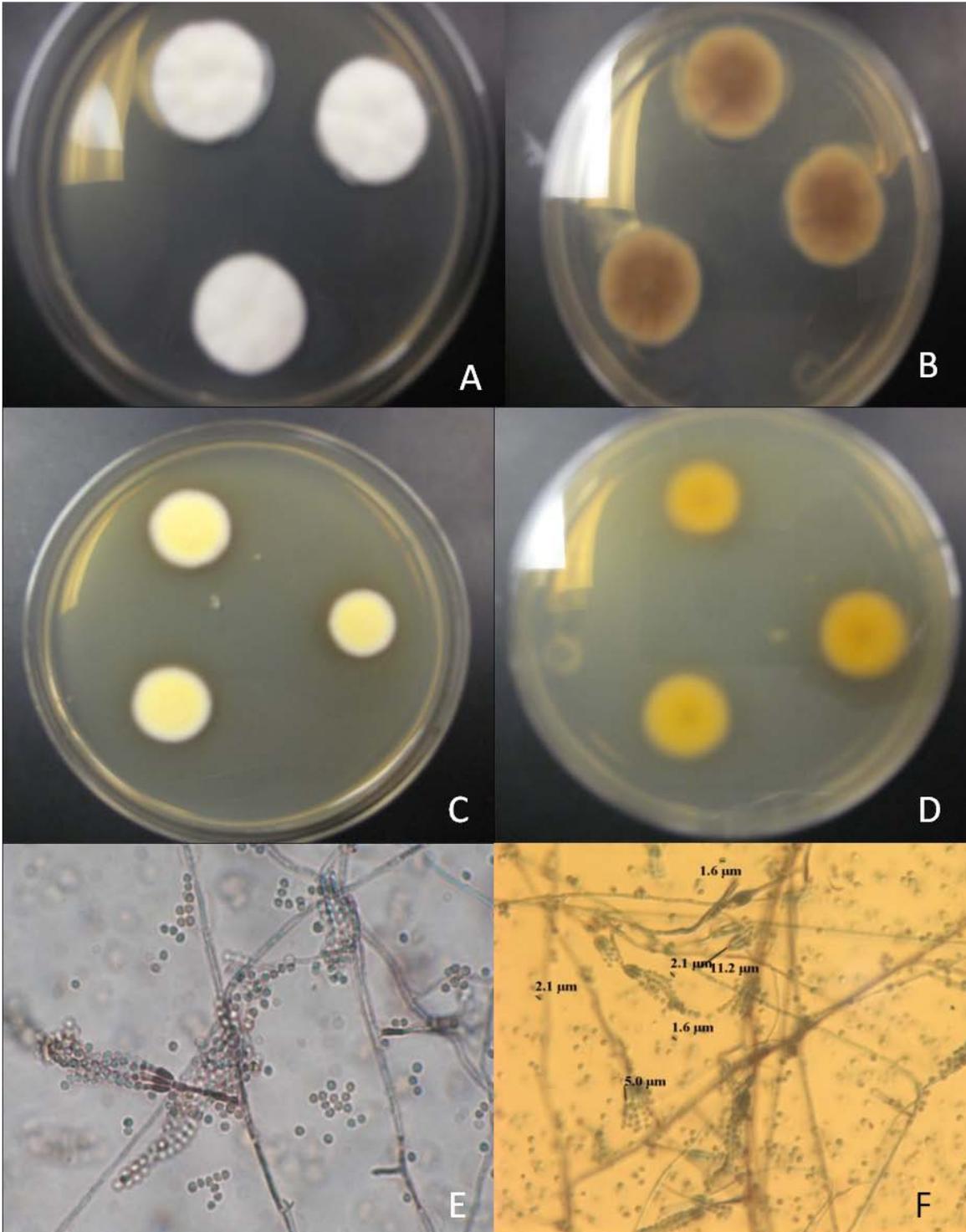


Figura 2.15 *Penicillium* spp (G) A. Colonias en CYA 25 B. Reverso C. Colonias en MEA D. Reverso en MEA E y F. Conidióforo monoverticilado, 40x

Penicillium spp. H

Subgénero *Aspergilloides* Dierchx.

En CYA 25 como en CYA 37 las colonias presentaron color blanco con reverso amarillo pálido. En CYA 37 formó pliegues y presentó un diámetro de 19 mm mientras que en CYA 25 el diámetro fue de 13 mm (Fig. 2.16 A). En MEA las colonias con un diámetro de 15 mm, eran color amarillo pálido con borde blanco y presentaron exudado, el reverso era amarillo pálido con el centro marrón (Fig. 2.16 C y D). En G25N la colonia con un diámetro de 19 mm era de color blanco y reverso amarillo pálido con el borde más claro.

Conidióforo pequeño de 12 μm , monoverticilado no vehiculado. Fiálidos aglomerados de un largo de 3.5 a 5 μm y conidias lisas de 1-2 μm (Fig.2.16 E y F).

Similar a *P. citreonigrum* Dierchx. Se diferencia en que presentó colonias de menor tamaño en CYA 25 y creció en CYA 37 unos 19 mm. Los colores de las colonias concuerdan con los descritos para *P. citreonigrum* Dierchx en los diferentes medios (Pitt,1985).

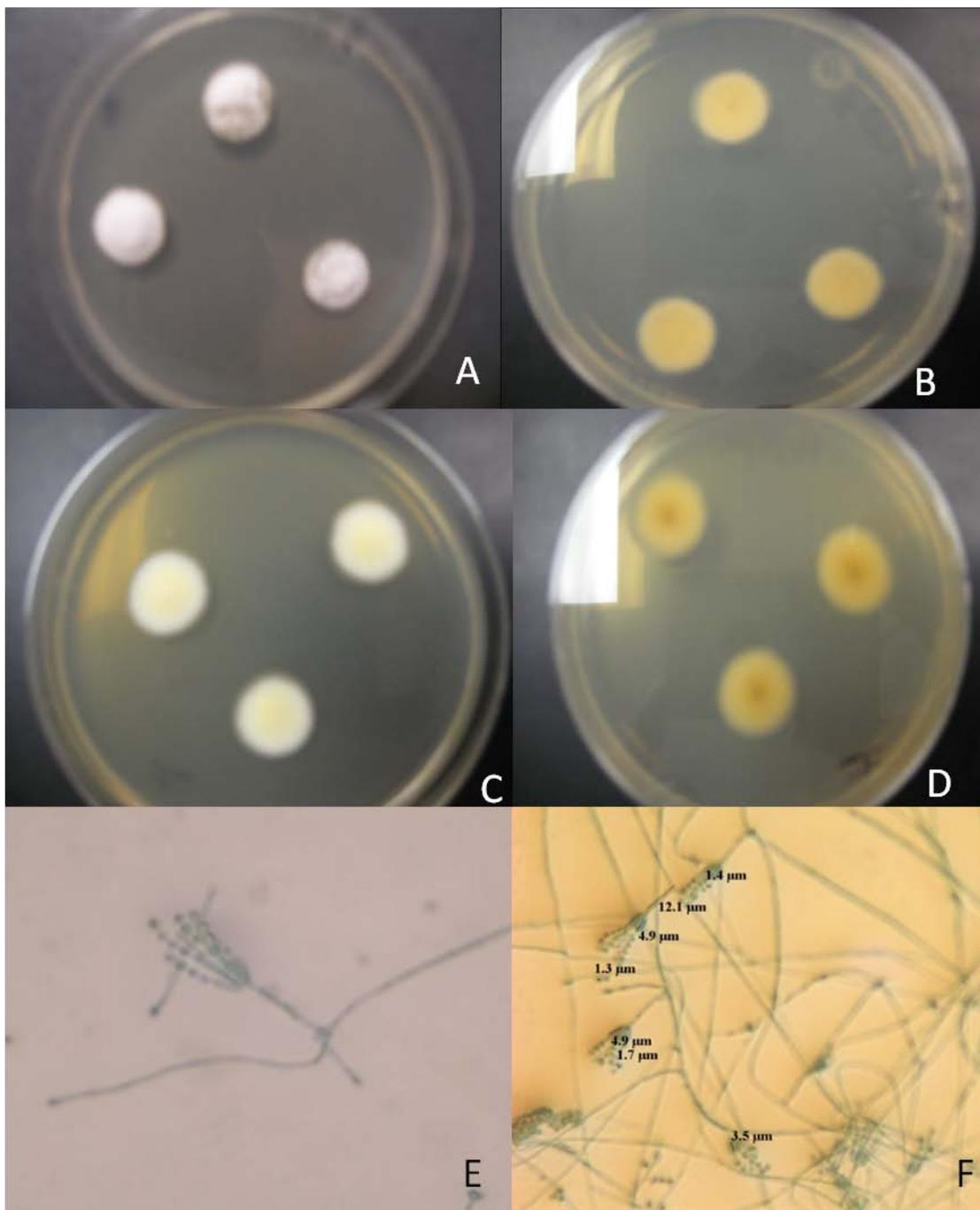


Figura 2. 16 *Penicillium* spp. (H) A. Colonias en CYA 25 B. Reverso C. Colonias en MEA D. Reverso E y F. Conidióforo monovertilado de *Penicillium* spp., 40x

Penicillium spp. N

Subgénero *Aspergilloides* Dierchx.

En CYA 25 el crecimiento promedio fue 13 mm de diámetro, las colonias eran de color blanco y reverso amarillo claro, presentando un punto oscuro en el centro de la colonia (Fig. 2.17 A y C). En CYA 37 las colonias presentaron el mayor tamaño, unos 19 mm y también eran de color blanco con pliegues y el reverso amarillo más intenso. En MEA las colonias presentaron un diámetro de 14 mm, de color amarillo y centro blanco, el reverso era amarillo (Fig. 2.17 C y D). En G25N las colonias fueron de menor tamaño alcanzando unos 12 mm, de color blanco y borde difuso, con apariencia filamentosa.

Conidióforo monoverticilado no vesiculado, pequeño de 10.6 μm . Fiálidos agrupados de un largo de 5.5 a 6.5 micrómetros con conidias lisas de 2 a 3 μm (Fig. 2.17 C y D).

Similar a *P. citreonigrum* Dierchx. Se diferencia en que produjo colonias de mayor tamaño en CYA 25 y MEA, creció en CYA 37 unos 19 mm. Los colores de las colonias concuerdan con los descritos para *P. citreonigrum* Dierchx en los diferentes medios (Pitt, 1985).

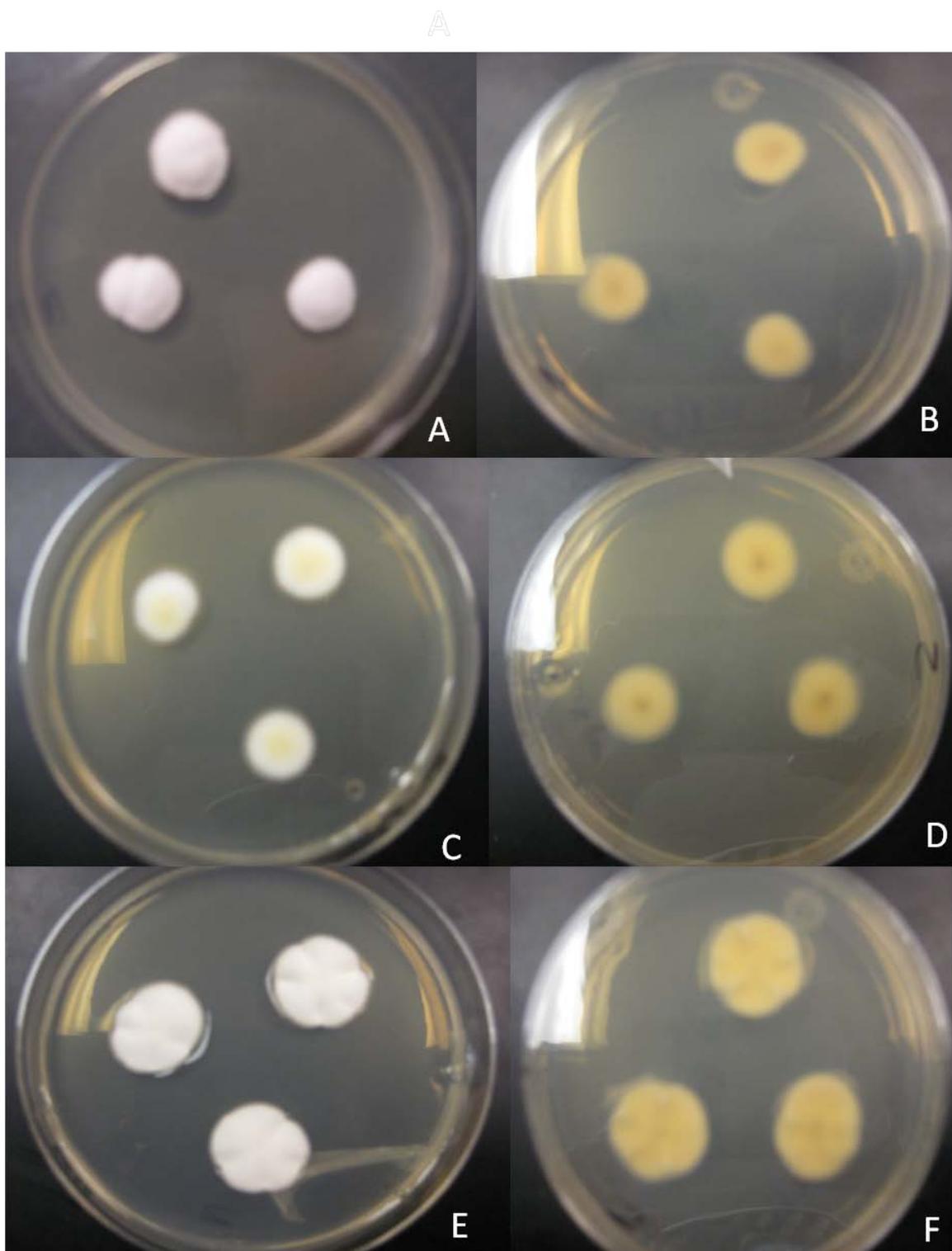


Figura 2.17 *Penicillium* spp. (N) A. Colonias en CYA 25 B. Reverso C. Colonias en MEA D. Reverso E. Colonias en CYA 37 F. Reverso

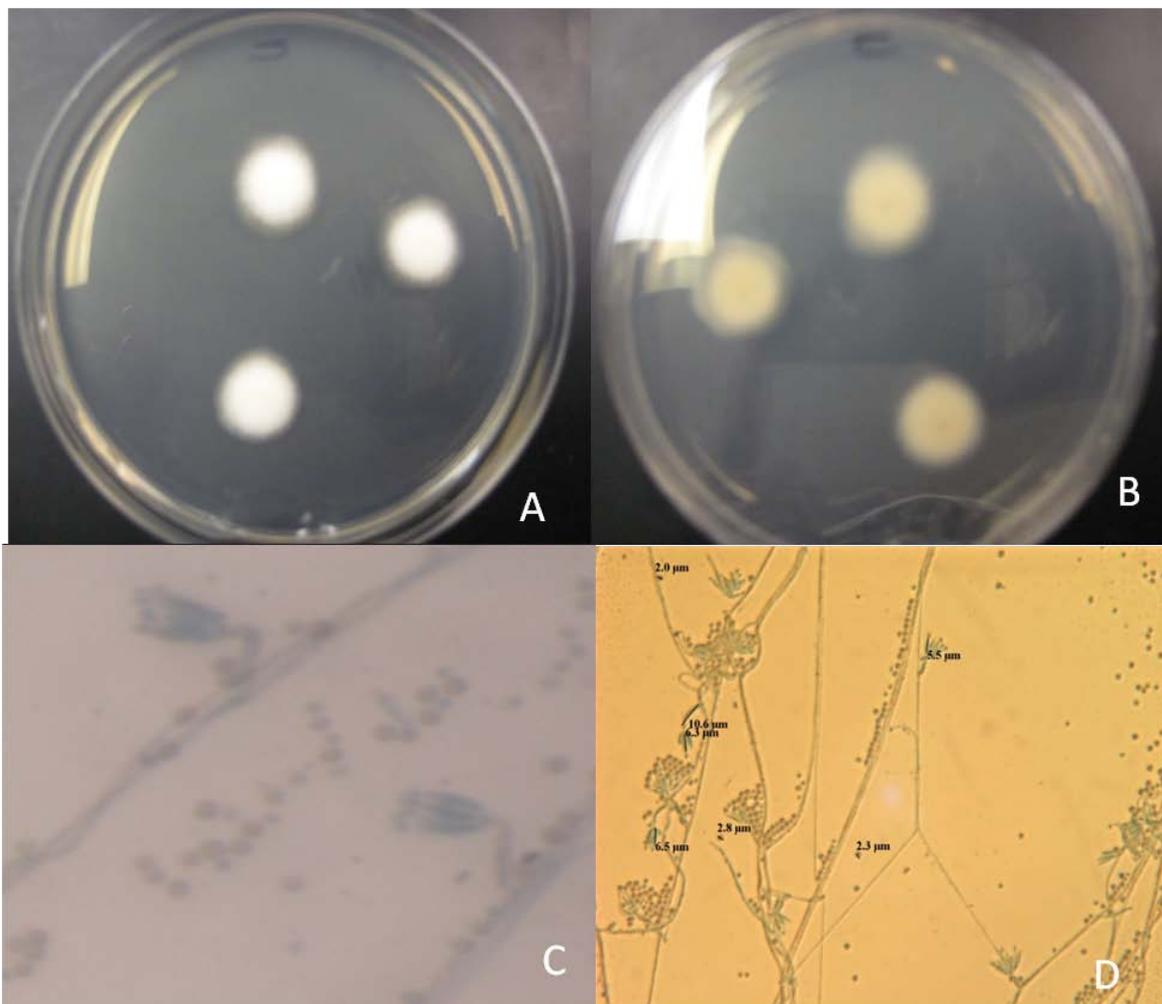


Figura 2. 17.1 A. Colonias en G25N B. Reverso C y D. Conidióforo monoverticilado de *Penicillium* spp. (N), 40x

Penicillium spp. O

Subgenus *Furcatum*

En CYA 25 se observaron colonias color verde y centro blanco con elevación. La apariencia es polvorienta con bordes definidos (Fig. 2.18 A). El reverso de color crema pálido. El diámetro fue de 30 mm. En CYA 5 las colonias presentaron color blanco con el centro verde de un diámetro de 5mm. En MEA las colonias fueron color crema a verde oliva con secciones de un tono marrón (Fig. 2.18 B). El reverso color crema pálido. Presenta pliegues y elevación al centro, tienen un diámetro de 35 a 38 mm.

Conidióforo biverticilado, mediano no veciculado de unos 89 μm . Los fiálidos se encuentran agrupados son de un largo de 6 a 7 micrómetros. Las metulas son uniformes de forma espatulada. Las conidias son lisas se observan alineadas en columnas, son de color amarillas a ámbar en su mayoría incoloras de 3 a 5 μm (Fig. 2.18 C y D) (Pitt, 1985).

Similar a *P. citrinum* varía en características de color de la colonia.

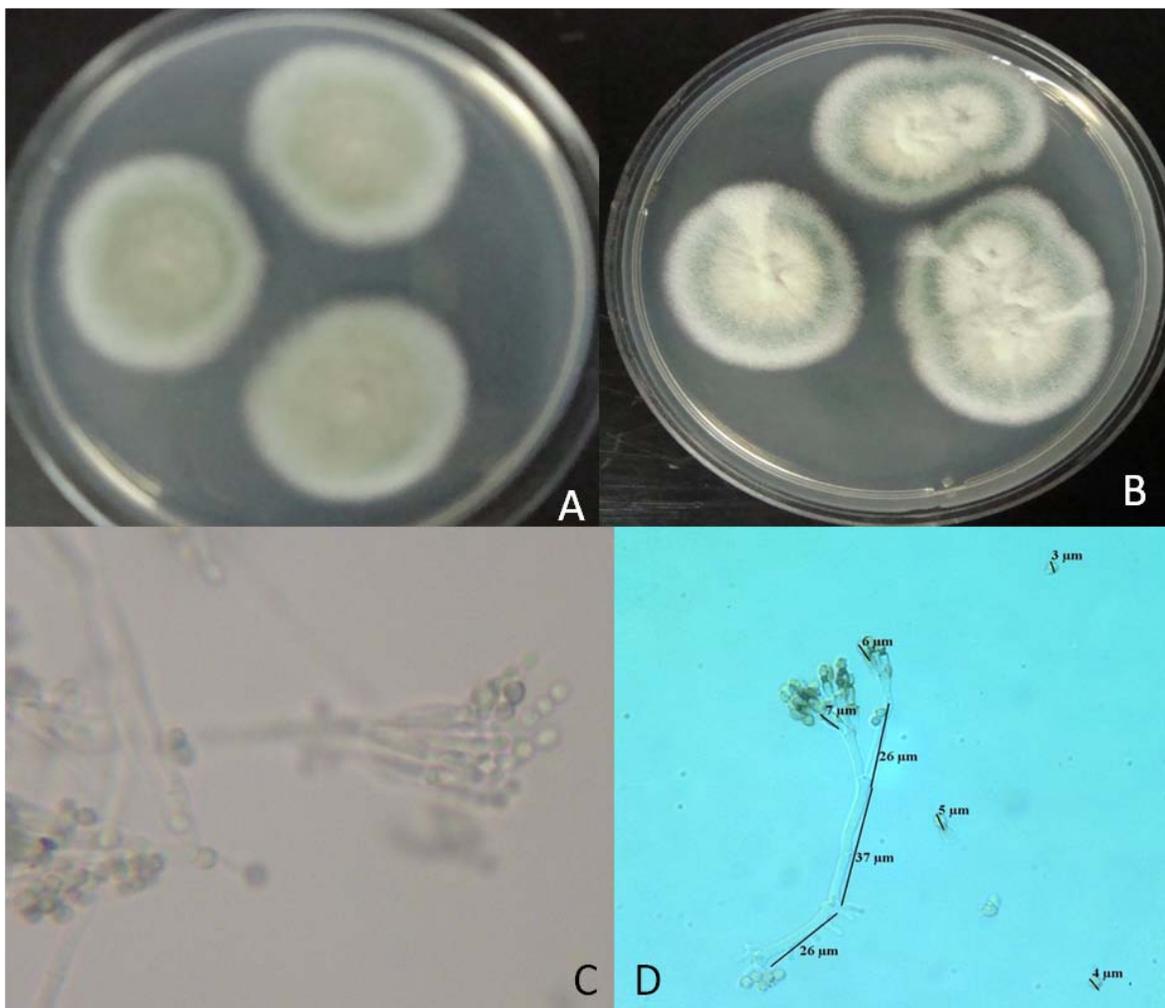


Figura 2.18 *Penicillium* spp. (O) A. Colonias en CYA 25 B. Colonias en MEA C y D. Conidióforo, 40x

Rhizopus spp.

Cigomiceto cuyo crecimiento de la colonia en medio PDA fue abundante en unos 3 días, es de color blanco y apariencia filamentosa (Fig. 2.19). Esporangios globosos y esporangiosporas, columelas vacías. Esporangióforos extensos y muy ramificados. Los rizoides se encuentran localizados bajo el esporangióforo (Fig. 2.19) (O'Donnell, 1979).

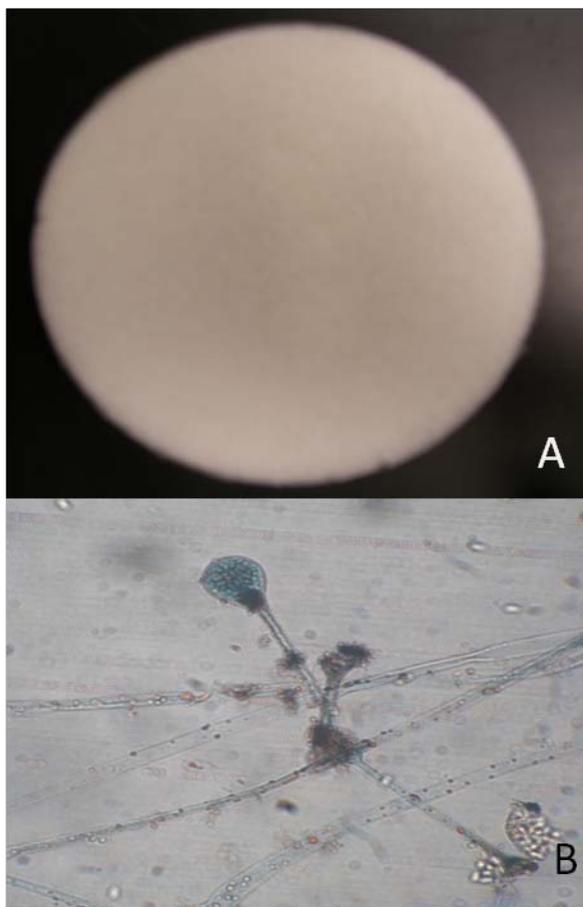


Figura. 2. 19 A. Colonia de *Rhizopus* en PDA.
B. Rizoides y Esporangio de *Rhizopus*, 60x.

Scopulariopsis spp. Bainier

Las colonias tienen un crecimiento abundante de apariencia polvorienta funiculosa, semejante a algodón en una semana tienen un diámetro de unos 50 mm. Las colonias presentaron color marrón a amarillo, semejante arena (Fig. 2.20 A). En ocasiones se presentan anillos marrones con tonos de crema claros a blanco sobre la colonia. El reverso es color marrón claro con tonalidad anaranjada, hacia el centro más oscuro de marrón a gris.

Conidióforo corto y ramificado de 10 a 30 μm , con un arreglo verticilado de filios ramificados. Las conidias simples o ramificadas en cadenas son rugosas o lisas en forma de pera con un diámetro de 6 a 7 μm en color marrón a ámbar, con superficie rugosa y base plana (Fig. 2.20 B y C).

La especie encontrada en el T3- BMC fue identificada como *Scopulariopsis brevicaulis* (Sacc.) Bainier (Fig. 2.20 A).

De acuerdo con Cuenca et al, (2006) el hongo es considerado como patógeno humano causante de hipersensibilidad, neumonías y dermatitis. Los reportes contagio han sido en pacientes inmunocomprometidos por lo que no se clasifica como un patógeno potencial. La especie produce compuestos tóxicos como el gas de arsina que es el resultado de la descomposición de arsénico. Estas reacciones ocurren común mente en el suelo como en otros sustratos que el hongo coloniza (Raper y Thom, 1968).

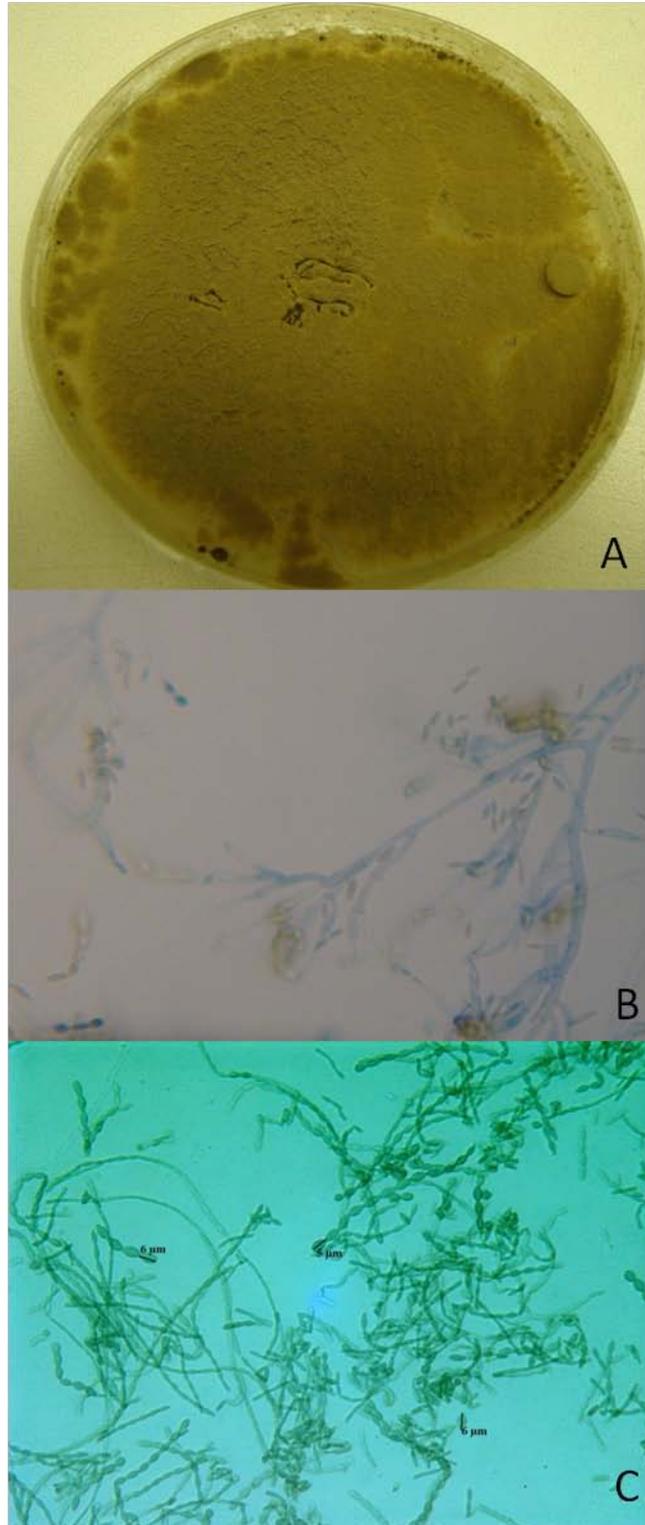


Figura 2. 20 *Scopulariopsis* spp.
A. Colonia en PDA B y C. Conidias y ramificaciones

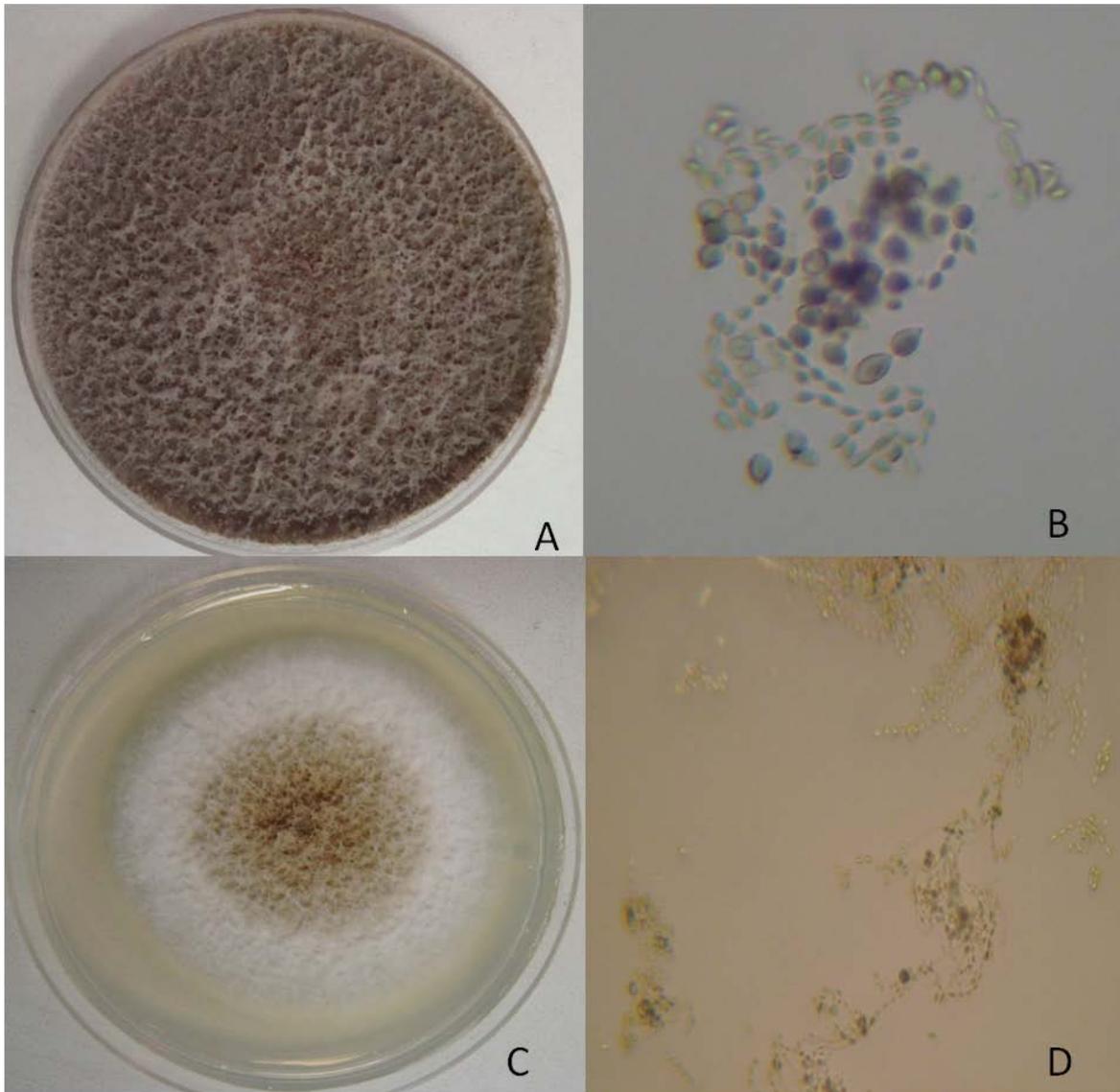


Figura 2.20.1 Colonias del género *Scopulariopsis* encontradas en el T5 A. y C. *Scopulariopsis* spp. B. Conidias D. Conidióforo de *Scopulariopsis* spp.

Trichoderma harzianum Rifai

Las colonias fueron de color verde y apariencia polvorienta fuciforme (Fig 2.31 A). Al inicio el desarrollo de la colonia presenta una coloración blanquizca hacia verde gris, semejante a mojado, con poco desarrollo del micelio. Luego la colonia desarrolla un color verde intenso y mayor densidad al centro, finalizando en el color verde con blanquizco. La colonia se desarrollo abundante en unos 3 a 4 días.

Conidióforos compactos de unos 16 a 18 μm . Las conidias son globosas de entre 3 a 4 μm , desarrolladas en fialidos que se producen en dirección opuesta a cada uno (Fig 2.21 B y C) (Rifai,1969).

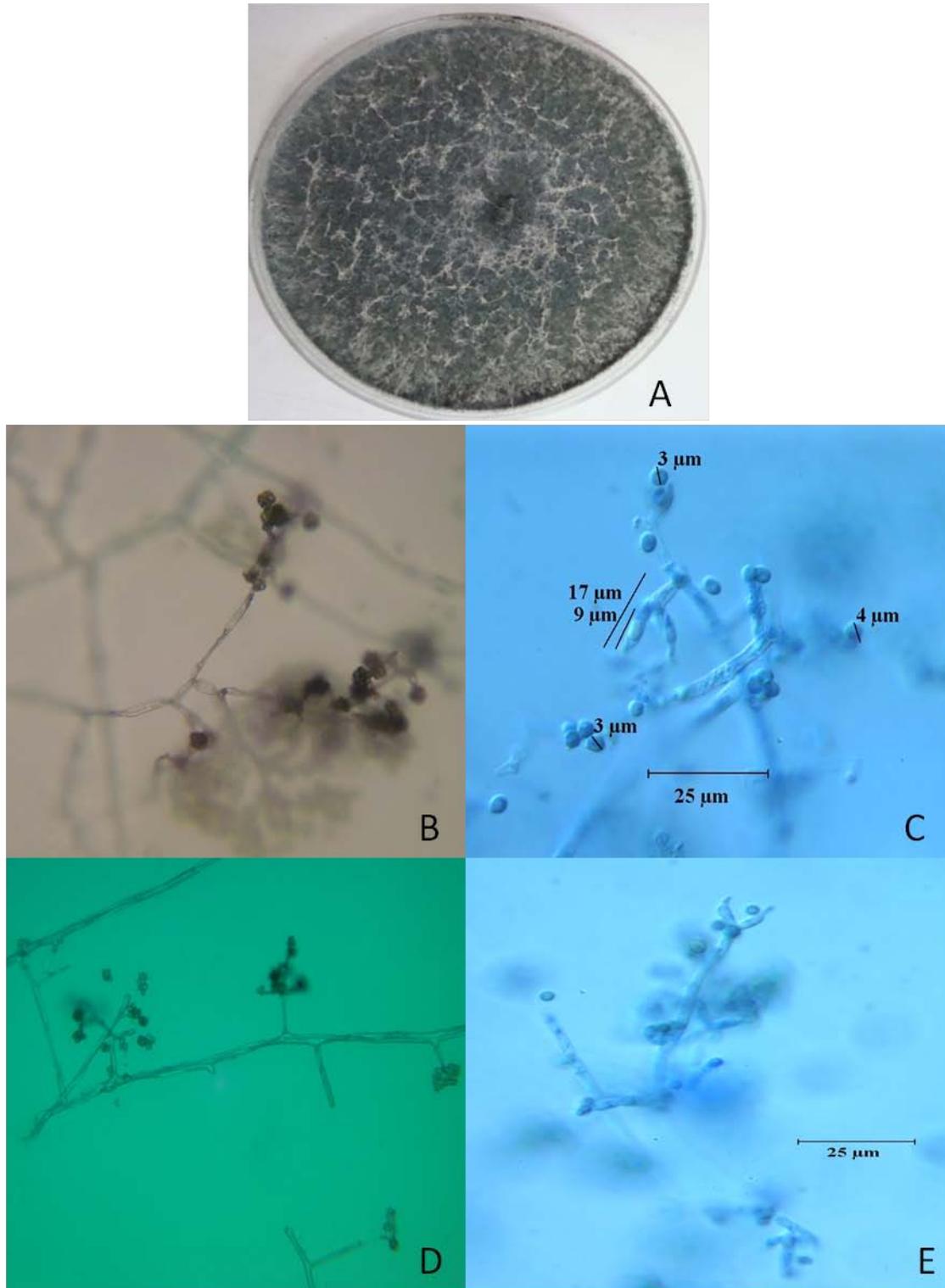


Figura. 2.21 *Trichoderma harzianum* A. Colonia en PDA B y D Conidióforos. C. y E. Conidióforo y fialidosporas, 40 x.

2.5 CONCLUSIONES

La mayoría de los hongos encontrados en el BMC no representan ser nocivos a los humanos. Los hongos identificados poseen características de antagonismo y como promotores de crecimiento o solubilizadores. Estos corresponden a la flora normal de hongos mesofílicos que colonizan la composta en el periodo de curación (Taiwo y Oso 2004). De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, concluimos que el BMC es un medio de cultivo viable y seguro para las plantas y los humanos que estén en contacto con el mismo, esto en relación al contenido microbiológico de hongos. Este puede ser utilizado como un sustrato en la producción de plantas ornamentales y ser un medio alternativo a la turba. Sin embargo, se recomienda el uso de protección de las vías respiratorias especialmente personas que sufren de alergias o con sistemas inmunológicos comprometidos y que estén en contacto con este sustrato. Los hongos, por su mecanismo de producción de esporas contaminan el aire y pueden poner en riesgo la salud. Los hongos fitopatógenos encontrados en el BMC son suprimidos por microorganismos antagonistas presentes en el mismo. De acuerdo con los resultados de esta investigación, el uso del BMC en la producción de plantas ornamentales y cultivos no representa un riesgo de pérdidas económicas durante la producción de plantas.

En esta investigación además, se realizó la caracterización microbiana de la turba estudiándose así su composición. La turba como medio de cultivo, ha sido la más usada en las últimas décadas por los productores de ornamentales a nivel mundial. Los hongos identificados en la turba son encontrados comúnmente en el suelo y en materia orgánica en estado maduro o durante el almacenamiento. La presencia de estos hongos puede estar asociada al tiempo en que la turba está expuesta al medio ambiente antes de ser empacada y mercadeada. Este es un medio que es empacado en algunas ocasiones al inicio del proceso de compostación (Airaksinen et al, 2005). Algunos de los hongos encontrados en la turba son termofílicos, potencialmente patogénicos a los humanos, representando

peligro a la salud. La presencia de estos hongos en este sustrato, no había sido reportada previamente. De este modo se confirma el contenido microbiológico de hongos en la turba y al compararlo con el del BMC resultan ambos sustratos con presencia de hongos con especies que pueden resultar patogénicas al ser humano. Por esta razón, se recomienda tomar precauciones al momento de utilizar ambos sustratos. Luego de evaluar el contenido microbiano de hongos de estos dos sustratos, es imperativo que se lleven a cabo estudios adicionales con estos sustratos orgánicos y con diversas marcas registradas utilizadas en la producción de cultivos.

2.6 LITERATURA CITADA

Alvarado, B. J. 2006. *Análisis económico de medio orgánico como alternativa a las mezclas comerciales utilizando turba para la producción de plantas ornamentales en tiestos*. Tesis, Departamento de Economía Agrícola, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. pp 16-18.

Agarry, O. O., F.A. Akinyosoye y F.C. Adetuyi. 2005. Antagonistic properties of microorganisms associated with cassava (*Manihot esculenta* Crantz) products. *African Journal of Biotechnology*. 4 (7) 627-632.

Ainbikapathy, V., A. Panneerselvam y R. Saravanamuthu. 2002. Antagonistic Effect of Soil Fungi to *Fusarium solani*. *Agriculture Science Digest*. 22 (1): 14 – 17.

Airaksinen, S, M. L. Heiskanen, H. Heinonen-Tanski, J. Laitinen, S.Laitinen, M. Linnainmaa, S. Rautiala. 2005. Variety in dustiness and hygiene quality of peat bedding. *Annuals Agriculture Environmental Medical*. 12: 53–59.

Barnett, H.L. y B.B. Hunter. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Fourth edition. APS Press. Saint Paul, Minnesota.

Basha, S. y K. Ulaganathan. 2002. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. *Current Science*. 82(12): 1457-63.

Bonito, G, O. S. Isikhuemhen, R. Vilgalys. 2010. Identification of fungi associated with municipal compost using DNA-based techniques. *Bioresource Technology*. 101, (3): 1021-1027.

Cardona, L. I. 2008. *Efectos del biosólido municipal compostado como medio de cultivo alternativo a la turba utilizado en la producción de pascuas (Euphorbia pulcherrima Willd. ex Klotzsch)*. Tesis, Universidad De Puerto Rico Recinto Universitario de Mayagüez, pp 38- 45.

Cantrell, S.A., D. G. Lodge, D. W. Minter, W. Ortíz Santana. (2006). *Hongos de Puerto Rico*. <http://www.cybertruffle.org.uk/puerfung/index.htm> [sitio internet, versión 1.00].

Cuenca-Estrella, M., A. Gomez-Lopez, M. J. Buitrago, E. Mellado, G. García -Efron y J. L. Rodríguez. 2006 . In vitro activities of 10 combinations of antifungal agents against the multiresistant pathogen *Scopulariopsis brevicaulis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50(6): 2248–2250.

Dhingra, O.D. y J.B. Sinclair. 1995. *Basic plant pathology methods*. Second Edition. Ed Lewis Publishers. CRC Press. Boca Ratón, Florida. pp. 434.

Duvenhage, J. A. 1999. Biological and chemical control of root rot. *South African Avocado Growers' Association*. 22:115-119.

Environmental Protection Agency, (EPA).1998. An analysis of composting as an environmental remediation technology, Capítulos 1 y 5.: 1-3.

Environmental Protection Agency, (EPA). 1999. Biosolids generation, use, and disposal in the United States. Section 5.2.1 Public Acceptance. 69-73.

Ezziyyani, M., C. Pérez Sánchez, A. S. Ahmed, M. E. Requena, y M. E Candela. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Anales de Biología 26: 35-45.

Guimarães, L. H., S. C Peixoto-Nogueira, M. Michelin, A. C. Rizzatti, V. C Sandrim, F. F. Zanoelo, A. C. Aquino, A. B Junior y M. De L. Polizeli. 2006. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. Brazilian Journal of Microbiology, 37:474-480.

Guzmán, C. y C. Campos. 2001. Indicadores de contaminación fecal en biosólidos aplicados en agricultura. Revista de la Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. 9: 59-67.

Houbraken, J., P. E. Verweij, A. J. Rijs, A. M. Borman y R. A. Samson. 2010. Identification of *Paecilomyces variotii* in clinical samples and settings. Journal of Clinical Microbiology. 48 (8): 2754–2761.

Khan, S. A., M. Hamayun, H. Yoon, H. Y. Kim, S. J. Suh, S. K. Hwang, J. M. Kim, I.J. Lee, Y. S. Choo, U. H Yoon, W. S Kong, B. M. Lee y J. G. Kim. 2008. Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. *BioMed Central Microbiology*. 8:231.

Klich, M. A. 2002. Identification of Common Aspergillus Species. Centraalbureau voor Schimmel cultures, Ulthecht, The Netherlands.

Kimura M., T. Yaguchi, D. A. Sutton, A. W. Fothergill, E. H. Thompson y B. L. Wickes. 2011. Disseminated human conidiobolomycosis due to *Conidiobolus lamprauges*. *Journal Clinical Microbiology*. 49(2):752-56.

Meriaux, A., P. Pageau, Y. Cormier, N. Goyer y C. Duchaine. 2006. Bioaerosols in peat moss processing plants. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 3(8):408-17.

Millner, P. D, P. B Marsh, R. B Snowden y J. F. Parr. (1977) Occurrence of *Aspergillus fumigatus* during composting of sewage sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. 34, (6): 765-772.

Muhammad, A., M. Waseem Abbasi y M. Javed Zaki. 2010. Bioefficacy of microbial antagonists against *Macrophomina phaseolina* on sunflower. *Pakistan Journal of Botany*. 42(4): 2935-2940.

- Naim, M. S y A. A. El-Esawy. 1964. Variations in the cultural characteristics of *Rhizoctonia solani*, and its antagonists: *Aspergillus terreus* and *Aspergillus flavus* occurring in the rhizosphere of cotton. *Mycopathologia*. 27 (1-2): 161-168.
- Nelson, R. T., D. TeStrake, B. J. Cochrane. 1998. The distribution of *Basidiobolus* and *Conidiobolus* in soil and litter al sites near Tampa, Florida. *Mycologia*. 90 (5): 761-766.
- Nicoletti, R., De Stefano M., De Stefano S., Trincone A. y Marziano F. 2004. Antagonism against *Rhizoctonia solani* and fungitoxic metabolite production by some *Penicillium* isolates. *Mycopathologia* 158: 465–474.
- O'Donnell, K.L. 1979. Zygomycetes in culture. Palfrey Contributions in Botany. Department of Botany, University of Georgia.
- Pitt, J.L. 1985. A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing.
- Raper, K. y C. Thom. 1968. A Manual of the Penicillia. Hafner Publishing Company.
- Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*. 116. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Ryckeboer, J., J. Mergaert, J. Coosemans, K. Deprins y J. Swings. 2003. Microbiological aspects of biowaste during composting is monitored compost bin. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 127–137.
- Sayer, J. A., S. L. Raggett y G. M. Gadd. 1995. Solubilization of insoluble metal compounds by soil fungi development of a screening method for solubilizing ability and metal tolerance. *Mycological Research*. 99(8):987-993.
- Sivanesan, A. 1987. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Dreschlera*, *Exserchillum* and their teleomorphs. *Mycological Papers*. C A. B International Mycological Institute. 158: 126- 127.
- Taiwo, L. B. y B. A Oso. 2004. Influence of composting techniques on microbial succession, temperature and pH in a composting municipal solid waste. *African Journal of Biotechnology*. 3 (4): 239- 243.
- Valenzuela, E., S. Barreras, y D. Pinochet. 2002. Solubilización de roca fosfórica – Carolina del Norte con cepas de *Apergillus niger* aisladas desde un suelo trumao. Recuperado de <http://www.uv.cl.com>, 28/8/2009.
- Ulacio, D., J. Salas, P. Querales, M. E. Sanabria. 2002. Microbiota del suelo de zonas productoras de papa del estado de Merida y su relación con *Rhizoctonia solani*. *Bioagro* 14 (1):11-16.

Ullah, M. H., M. Aslam, S.T. Sahi y A. Habib. 2011. Evaluation of antagonistic fungi against charcoal rot of sunflower caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. African Journal of Environmental Science and Technology. 5(8): 616-621.

Whitelaw, M. 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. Advances Agronomy. 69: 99-152.

Yamaji K., Y. Hashidoko, Y. Fukushi y S. Tahara. 2005. Chemical Response of *Picea glehnii* seed-epiphytic *Penicillium* species to *Pythium vexans* under *In Vitro* competitive conditions for mycelial growth. Journal of Chemical Ecology. 31(4): 805-817.

2.7 APÉNDICE

2.7. 1 Claves Taxonomicas

- A laboratory guide to common *Penicillium* species (Pitt,1985)
- A Manual of the *Penicillia* (Raper y Thom, 1968).
- A revision of the genus *Trichoderma* (Rifai,1969)
- Graminicolus species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs (Sivanesan, 1987)
- Identification of common *Aspergillus* species (Klich, 2002)
- *Zygomycetes* in culture (O'Donnell, 1979)

2.7.2 Recetas para la preparación de medios de cultivo

2.7.2.1 OHIO

Para 1 L del medio; 20 gramos de agar, 5 g de glucosa, 2g de extracto de levadura, 1 g de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 1 g de $NaNO_3$, 1 g de KH_2PO_4 , 1 g de Oxygall, 1 g propionato de sodio 0.5 g de cloramfenicol y 0.5 g de sulfato de estreptomina (diluidos en 1 ml de alcohol etílico al 90%) para diluir los antibióticos.

2.7.2.2 CYA

Preparado con 1 g de K_2HPO_4 , 10 ml de Czapek, 5 g de levadura, 30g de sacarosa,15 g de agar y 1 L de H_2O

2.7.2.3 CYA 20S

Preparado con 1 g de K_2HPO_4 , 10 ml de Czapek, 5 g de levadura, 200g de sacarosa, 15 g de agar y 1 L de H_2O

2.7.2.4 G25N

Preparado con 0.75 g de K_2HPO_4 , 7.5 ml de Czapek, 3.7 g de Extracto de levadura, 169.5 ml de glicerol, 12 g de agar y 750 ml de H_2O

2.7.2.5 MEA

Preparado con 20 g de extracto de malta, 1g de peptona, 20 g de glucosa, 20 gramos de agar y 1 L de H_2O .

3. DETERMINAR LA PRESENCIA O AUSENCIA DE *Escherichia coli*, COLIFORMES Y *Salmonella* spp. EN EL BIOSÓLIDO MUNICIPAL COMPOSTADO Y LA TURBA

Grisselle E. Pérez Sánchez ¹, Myrna Alameda Lozada ² María Del Carmen Librán Salas² y Lydia Rivera Vargas²

¹ Estudiante Graduada y ² Catedráticas Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez

3.1 RESUMEN

Las bacterias entéricas representan una gran parte de la microflora nativa del Biosólido Municipal Compostado (BMC). Entre este grupo se encuentran bacterias patógenas de humanos como *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. La Agencia de Protección Ambiental (EPA) rige los procesos de compostación de biosólidos bajo la regulación 40 CFR-503. La regulación exige un número limitado de *E. coli*, *Salmonella* y coliformes totales para clasificar el BMC y autorizar su uso. Bajo esta regulación no es necesario identificar los coliformes totales presentes en el sustrato por lo que fue el objetivo de este estudio. Se determinó la presencia o ausencia de *E. coli* y *Salmonella* spp. en cuatro tratamientos; tres muestras de composta (TC1, TC2, y TC3) y una de turba utilizada como el tratamiento control (TC). Para la detección de coliformes se utilizó el método de filtración por membrana y la prueba Colilert® (IDEXX Laboratories, Maine). Los coliformes totales fueron detectados en todos los tratamientos de BMC utilizando ambas pruebas. En la turba no se detectaron coliformes en ninguna de las pruebas realizadas. *E. coli* fue detectada en los tratamientos TC1 y TC3. *Salmonella* spp. no fue detectada en ninguno de los tratamientos evaluados. Los coliformes totales identificados en los tratamientos de BMC fueron: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Aeromonas encheleia*, *Escherichia fergusonii*, *Pasteurella bettyae*, *Pantoea stewartii* ss *stewartii*, *Rahnella aquatilis* y *Vibrio tubiashii* todas han sido reportadas como patógenos oportunistas. La presencia de estas bacterias en el sustrato podría poner en riesgo la salud de quienes manejan este medio de cultivo.

3.2 INTRODUCCIÓN

El Biosólido Municipal Compostado (BMC) por su fuente de origen posee una gran diversidad de bacterias entéricas (Tyler y Triplett, 2008). El grupo de las Enterobacterias, en las que se incluyen los patógenos humanos de *Salmonella* y *Escherichia coli* tienen la capacidad de sobrevivir por largo tiempo en el suelo y colonizar el interior de las plantas. Estas bacterias patógenas han desarrollado resistencia a antibióticos y son capaces de transmitirla a bacterias comunes del suelo modificando la microbiología de los suelos (Edrington et al., 2009). De acuerdo con Guzmán y Campos, (2001), los sustratos en los que no se ha completado el proceso de compostación por el periodo necesario están en riesgo de contener microorganismos patógenos como bacterias de tipo coliformes.

La Agencia de Protección Ambiental (EPA) regula el control de patógenos en los biosólidos compostados mediante pruebas requeridas para autorizar y clasificar su uso en la agricultura. De acuerdo a la regulación 40 CFR-503 (EPA, 2007), la cual rige los procesos de compostación de biosólidos, éstos se clasifican según el contenido de patógenos entre estas bacterias coliformes. Estas pruebas determinan la densidad de coliformes fecales y son utilizadas como indicador potencial de la presencia de bacterias patógenas (EPA, 1992; Guzmán y Campos, 2001). De acuerdo con Yanco, (1988) la presencia de coliformes en el sustrato es un indicador de contaminación con *Salmonella* spp. Las muestras que contengan menos de 1,000 coliformes fecales por gramo de peso seco de composta indica que los microorganismos patógenos han sido eliminados (EPA, 1998). *E. coli* representa menos de un 1% de la población de coliformes fecales (Yanco, 1988) por lo que la mayoría de los coliformes totales no se han identificado. Las bacterias que se clasifican como coliformes totales se contabilizan bajo un grupo sin conocer su género y especie. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue la detección de *E. coli* y *Salmonella* spp. y la identificación de coliformes totales. De este modo es posible obtener una identificación de las poblaciones de microorganismos potencialmente patogénicos que se encuentran bajo la clasificación de coliformes totales.

De acuerdo con Hassen et al., (2001) durante la fase termofílica de la composta las poblaciones de las bacterias, *E. coli* y *Streptococcus* disminuyen de 2×10^7 a 3.1×10^3 y 10^7 a 1.5×10^3 células/peso seco, respectivamente; mientras que las bacterias mesofílicas no coliformes se reducen de 5.8×10^9 a 1.8×10^7 células/g inicialmente. Las bacterias del género *Staphylococcus* son dominantes durante la fase mesofílica en el inicio de la compostación, luego las bacterias Gram positivas como *Bacillus* spp. colonizan la composta durante la fase termofílica predominando el ciclo completo de compostación. Las bacterias patógenas oportunistas, Gram negativas como *Pseudomonas* (28%), *Serratia* (20%), *Klebsiella* (11%) y *Enterobacter* (5%) aparecen en la fase de curación y maduración representando un serio problema de sanidad y calidad de la composta (Hassen et al., 2001 y Boulter et al., 2002). La disminución en la temperatura durante la fase de curación de la composta permite que estas bacterias colonicen la composta nuevamente. Estas bacterias permanecen en el ambiente, en equipos de manejo, y desarrollan estructuras de supervivencia siendo presentes en los nuevos lotes (Hussong et al., 1985). La incidencia de bacterias patógenas en la turba también ha sido reportada por Meriaux et al., (2006) ya que esta se encuentra expuesta al ambiente en las plantas de procesamiento bajo condiciones favorables para la colonización de microorganismos patógenos.

Las investigaciones previas han sugerido la necesidad de un monitoreo de la sucesión microbiana para determinar el manejo efectivo y asegurar la calidad de la composta (Ryckeboer et al., 2003). Teniendo en cuenta estos aspectos, los análisis microbiológicos constituyen un elemento importante para determinar la calidad sanitaria del BMC. En estudios previos realizados, en Puerto Rico dónde se evaluó el BMC obtenido de la Planta de Procesamiento Caribbean Composting de Arecibo, P.R. y muestras de la Planta de Composta de la Autoridad de Acueductos y Alcantarillados de Mayagüez, P.R., reportaron la ausencia de *Salmonella* spp., aunque mostraron la presencia de coliformes fecales (Pike, 2009).

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Determinación de la presencia o ausencia de *E. coli* y coliformes totales

El BMC estudiado fue obtenido de la Planta de Procesamiento de Composta de Mayagüez, de la Autoridad de Acueductos y Alcantarillados (AAA). Se analizaron las muestras de acuerdo al “*Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*” (American Public Health Association, 1992). Se siguieron las recomendaciones de control de calidad descritas en el “*Manual for the Certification of Laboratories Analyzing Drinking Water: Criteria and Procedures, Quality Assurance*” (EPA, 1992). Se realizaron pruebas de filtración por membrana descritas en el Método 1604 (EPA, 2002) para análisis de muestras de BMC y turba, tratamiento control (TC). Los parámetros de comparación fueron la presencia o ausencia de coliformes (C) en los tratamientos. Se evaluaron tres muestras de composta (BMC 100%) que fueron los tratamientos (TC1, TC2, y TC3) los cuales provinieron de una misma pila aerostática que cumplía con los periodos requeridos de compostaje. La pila mencionada anteriormente había completado el periodo de curación el 3 de noviembre de 2011. Al momento de ser colectada la muestra el 12 de marzo de 2012 la pila contaba con 129 días de maduración en almacenamiento en la planta de composta. Para la evaluación de las muestras se suspendieron 10 g de composta en 90 ml de agua estéril, que fueron agitados mecánicamente (“shaker”) por 15 minutos. Se realizaron cuatro diluciones a partir de la primera extrayendo 10 ml de la suspensión y transfiriéndolos a 90 ml agua. Se utilizaron la tercera y cuarta dilución. Los filtros de membrana (milipore) de 47mm y con poro de 45 μm se colocaron en un embudo de filtración conectado a una bomba de vacío manual. Se filtraron 100 ml de cada dilución. Los filtros de membrana se humedecieron con 30 ml de agua estéril antes de proceder a filtrar. El filtro de membrana se retiró del embudo utilizando pinzas estériles y se colocó en un plato Petri con agar MI (BD, BBL TM) (EPA, 2002). Cada tratamiento fue replicado tres veces, e incubados a 35 °C en una incubadora (*Science Teaching Incubator*) por 24 horas. Se confirma la

presencia y el crecimiento de bacterias al observarse bajo luz ultravioleta (365nm) coloración azul o fluorescencia en las colonias. El método utilizado tiene una capacidad de detección de una célula de *E. coli* o coliforme por 100 ml.

3.3.2 Detección de bacterias con el método Colilert®-18 (Quantitray-2000)

El método de detección Colilert®-18 (Quantitray-2000) (IDEXX Laboratories, Maine) fue utilizado para confirmar la presencia o ausencia de *E. coli* y coliformes totales de los tratamientos analizados previamente por la prueba de filtración por membrana descritos en el Método 1604 (EPA, 2002). Se utilizaron las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} (10:100 ml de agua) de cada uno de los tratamientos. Se siguieron las indicaciones de la prueba para la preparación de la muestra incubación y lectura de la misma. Los resultados positivos de la prueba deben mostrar una coloración amarilla para la presencia de coliformes totales mientras que para *E. coli* la coloración es fluorescente bajo luz ultravioleta (365nm). La prueba de Colilert® puede detectar bacterias a una concentración de 1ufc/100 ml hasta 2,419 ufc/ 100 ml.

3.3.3 Detección de la presencia de coliformes totales

Se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} a 10^{-3} a partir de 10g de cada tratamiento (TC1, TC2, TC3 y TC) que fueron inoculados en el medio de cultivo Bacto® Endo Agar. Estos fueron incubados a 35 °C por 24 horas. Este método de detección fue utilizado para confirmar la presencia de coliformes totales en los tratamientos antes mencionados. De estos se contabilizó el número de UFC/100 ml de cada placa y se tomaron tres colonias al azar que presentaron coloración roja, característica de la fermentación de lactosa. Las colonias fueron transferidas a Trypticase Soy Agar (TSA). Se utilizó la Tinción Gram para confirmar las bacterias como Gram negativas y la pureza de las colonias.

3.3.3.1 Identificación de las bacterias mediante el método BIOLOG®.

Para la identificación por género y especie se utilizaron las pruebas de identificación, BIOLOG® (Boulter et al., 2002). El método BIOLOG® MicroLog 3-Microstation System (V.4.2) de Biolog, Inc. (Hayward, CA.) para la identificación de bacterias, está basado en la oxidación de 95 fuentes de carbono y la reducción del indicador violeta de tetrazolio. La oxidación positiva de la fuente de carbono es observada por un cambio en color, el cual es determinado en un intervalo de onda, midiendo la densidad óptica con un espectrofotómetro. Este sistema compara con su base de datos el patrón de la oxidación de las fuentes de carbono de las bacterias a identificarse.

Las bacterias Gram negativas entéricas se crecieron en el medio BUGM™ (Biolog Universal Growth Medium) durante 24 horas a 35° C. La suspensión bacteriana se preparó en tubos con fluido de inoculación (GN/GP Inoculating Fluid) (BIOLOG®) suplementado con tres gotas de trioglicolato de sodio (BIOLOG®), utilizando un espectrofotómetro (*Spectronic-21 Milton Roy Company, USA*) a 590nm hasta lograr una transmitancia de 61 % +/-2. Las suspensiones bacterianas se inocularon (150 µl) en las fosas de las microplacas GN2 BIOLOG®. Las microplacas fueron incubadas a 35° C por 24 horas y la lectura de estas fue utilizando el lector Microlog® (Micro Station System 4.2) a las 4 a 6 horas y a las 18 a 24 horas.

3.3.4 Determinación de la presencia o ausencia de *Salmonella* spp.

De cada uno de los tratamientos antes mencionados (TC1, TC2, TC3 y TC) se tomaron muestras de 25 g para la preparación de una suspensión de 100 ml. Estas se colocaron en un agitador mecánico por 15 minutos. Las suspensiones fueron inoculadas en caldo nutritivo 3M™ TECRA™ UNIQUE. Se siguieron las indicaciones y períodos de incubación recomendados por el fabricante de la prueba 3M™ TECRA™ UNIQUE. La prueba es utilizada para la detección de *Salmonella* spp. Un cultivo puro de *Salmonella* spp. se utilizó como tratamiento control para confirmar los resultados. Se evaluaron los 4 tratamientos antes

mencionados con tres repeticiones tres veces (dos de ellos fueron incubados a 42° C y uno a 36° C) ya que la prueba recomienda la incubación bajo ambas temperaturas. Se utilizó una espátula provista en los materiales de la prueba, que contiene un reactivo indicador para determinar la presencia o ausencia de la bacteria. La espátula fue introducida en forma secuencial en la bandeja con las muestras. Esta espátula posee 4 secciones, la sección número 1 es el control positivo, sección número 2 control negativo, la sección número 3 y 4 presencia o ausencia de la bacteria. La prueba positiva debió observarse con un cambio a color rosado en la sección 4, mientras la ausencia del patógeno debía permanecer incolora.

3. 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 Determinación de la presencia o ausencia de *E. coli* y coliformes totales

La presencia o ausencia de *E. coli* y coliformes totales fue confirmada con el método de filtración por membranas recomendado por la Agencia de Protección Ambiental (EPA, 2002) realizado a los tratamientos de BMC y turba. Los resultados de los análisis con el método de filtración por membranas confirmaron la presencia de *E. coli* y coliformes totales, sin embargo no se pudo cuantificar el total de colonias existentes. El crecimiento de las colonias en las placas fue de forma aglomerada con difusión hacia los bordes de la membrana afectando la cuantificación y enumeración (Fig.3.1). Este crecimiento puede ser causado por la turbidez de la muestra, siendo necesarias más diluciones. El crecimiento en masa y amorfo observado en las colonias estudiadas coincide con el resultado descrito en el Método 1604 (EPA, 2002) TC⁺ EC⁺ (TNTC), TC (total coliforms), EC (*E. coli*), TNTC (too numerous to count or confluent). Este resultado se reporta para todos los tratamientos analizados de BMC y turba, lo que indica que la densidad de crecimiento en el filtro fue muy numeroso para ser contado o confluyente. El término confluyente es utilizado en la interpretación de resultados de esta prueba al referirse a colonias de *E. coli* y coliformes totales que bajo luz ambiente no muestran la coloración que representa su identificación y bajo luz ultravioleta

ambos presentan fluorescencia (EPA, 2002). De igual modo pueden presentarse colonias que carezcan de la fluorescencia aún siendo coliformes, esto debido al metabolismo de las enzimas indicadoras en el medio de cultivo como MUGal y el IBDG para la detección de coliformes totales y *E. coli* respectivamente (EPA, 2002).

En el tratamiento TC (100% turba) se observaron colonias definidas de coloración azul a blanco y azul verdosas indicativas de la presencia de coliformes totales y *E. coli*. Además, se observan colonias verdes y verde amarillo las cuales no son consideradas coliformes bajo el Método 1604. Las colonias de *E. coli* bajo luz ambiente debían mostrar coloración azul y bajo luz ultravioleta ser fluorescentes con coloración azul verdosa, en cambio las colonias de coliformes totales debían presentar una fluorescencia de azul a blanca bajo luz ultravioleta. La presencia de colonias fluorescentes color verde, no azul representa otras especies no coliformes. El método 1604 describe como un factor poco común que puede ocurrir el desarrollo de colonias menores de 0.5 mm de color azul con fluorescencia, estas no son consideradas *E. coli*. Las colonias de *E. coli* tienen un mayor tamaño de 1 a 3 mm de diámetro, si estas colonias pequeñas se desarrollan en el medio la muestra no es considerada como *E. coli* (EPA, 2002).

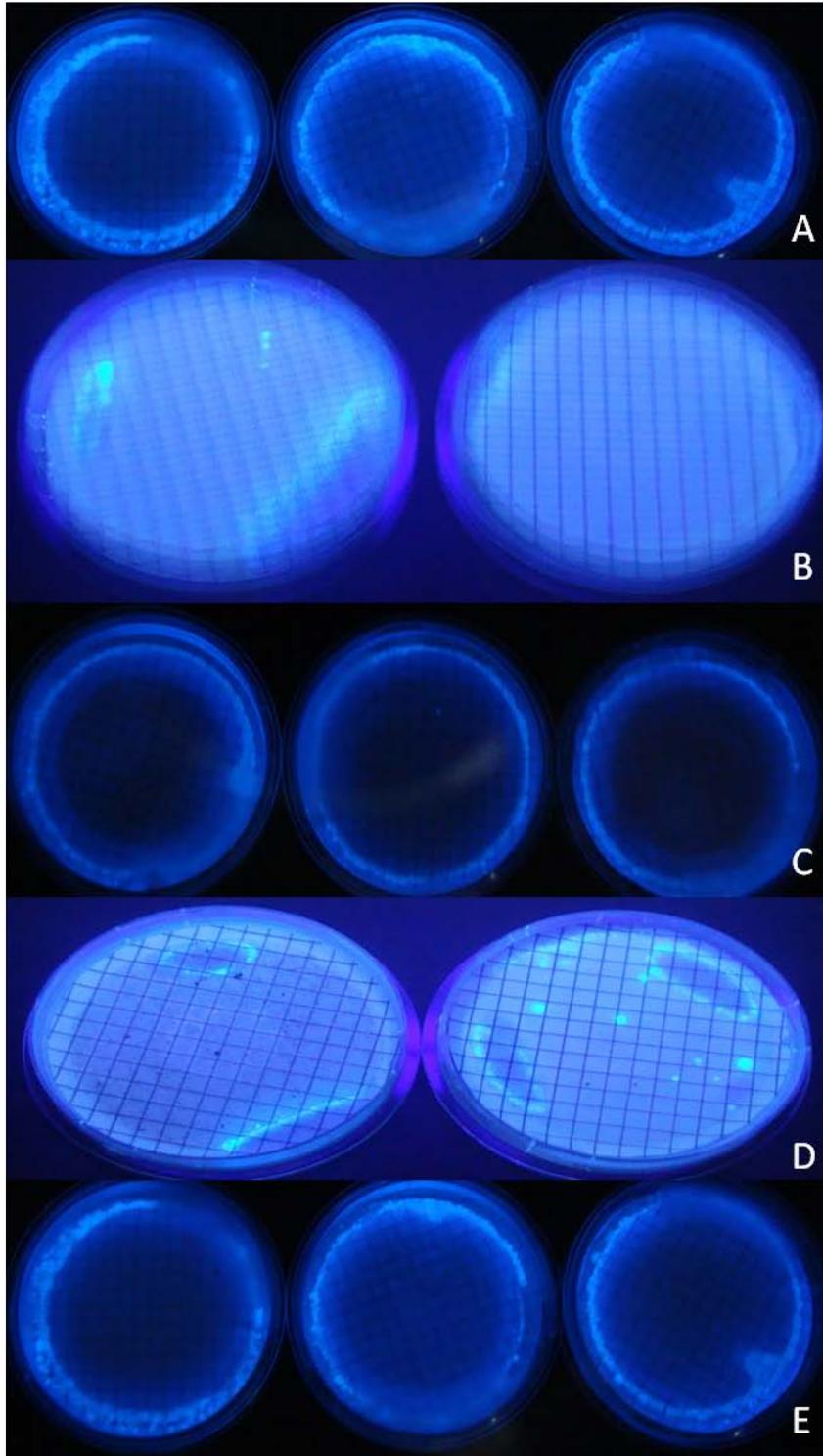


Figura 3.1 Crecimiento en agar MI. Las colonias con fluorescencia bajo luz ultravioleta representan coliformes totales en el método 1604. A. TC1 (10^{-3}) B. TC1 (10^{-4}) C. TC2 (10^{-3}) D. TC2 (10^{-4}) E. TC3 (10^{-3})

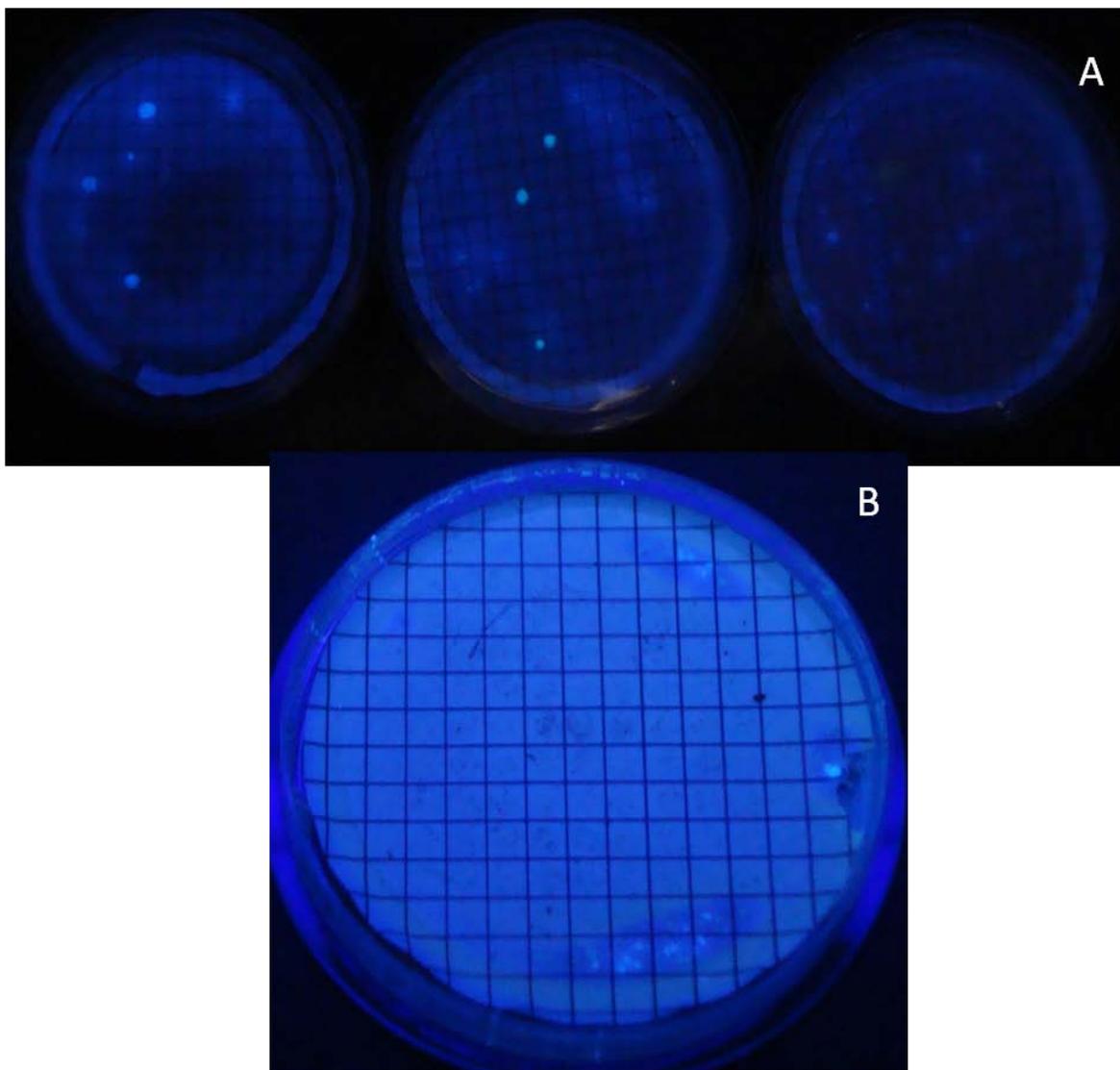


Figura 3.2 Crecimiento en agar MI.
A. TC (10^{-3}) B. TC (10^{-4})

3.4.2 Detección de bacterias con el método Colilert®-18 (Quantitray-2000)

Los resultados obtenidos en el método de filtración por membranas fueron confirmados utilizando la prueba Colilert® demostrando la presencia de coliformes totales en todas las muestras de BMC (Tabla 3.1). La presencia de *E. coli* en esta prueba fue positiva para los tratamientos de BMC (TC1 y TC3) (Fig. 3.4). Se observó coloración azul y verdosa en las fosas positivas a la presencia de *E. coli*. En el TC el resultado fue negativo para la presencia de coliformes totales y *E. coli* contenido el NMP/100 ml menor de 1 (Fig. 3.3 y 3.4).

Los diversos resultados de los tratamientos analizados en el Método 1604 y la prueba Colilert® sobre la presencia de *E. coli* en el TC2 y el TC pueden ser explicados debido al desarrollo de las colonias pequeñas con características de fluorescencia que no son *E. coli* y se desarrollaron en el medio de cultivo MI (EPA, 2002).

Tabla 3.1 Número más probable de coliformes totales en Biosólido Municipal Compostado (BMC) y turba

Tratamientos¹	NMP de Coliformes	NMP de <i>E. coli</i>
TC 1 ²	292.8	4
TC 1 ³	15.6	3
TC 2 ²	358.6	<2
TC 2 ³	<3	<3
TC 3 ²	922.2	254.8
TC 3 ³	129.6	21.9
TC ²	<2	<2
TC ³	<3	<3

¹Tratamientos BMC (TC 1, TC 2 y TC 3) 100% turba (TC)

²Dilucion 10⁻²

³Dilucion 10⁻³

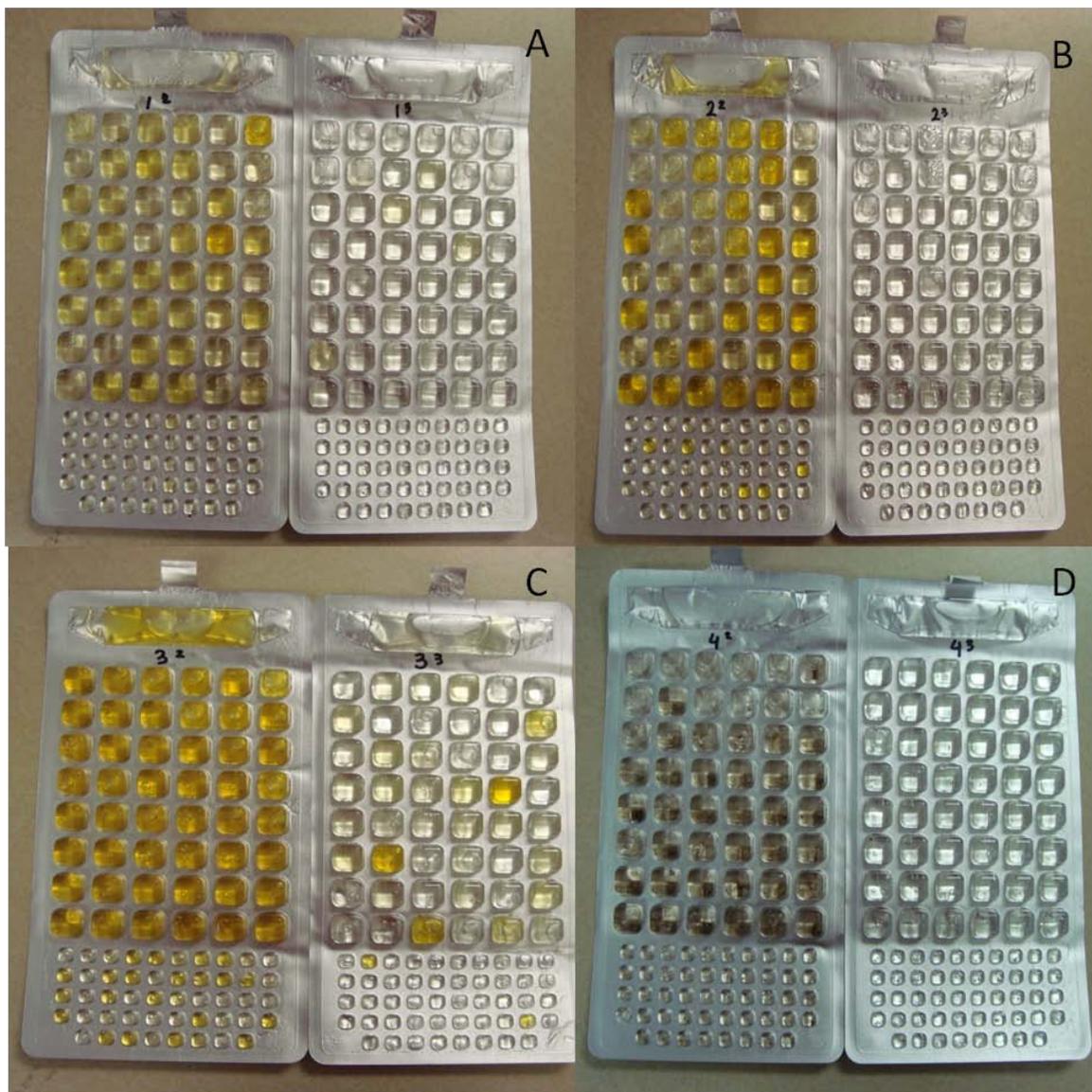


Figura 3.3 Resultados para la presencia de coliformes totales utilizando el método Colilert. Las fosas con color amarillo son positivas para la presencia de coliformes totales en los tratamientos de BMC. Las fosas incoloras en el tratamiento control son negativas .
A. TC1, B. TC2, C. TC3 y D. TC.

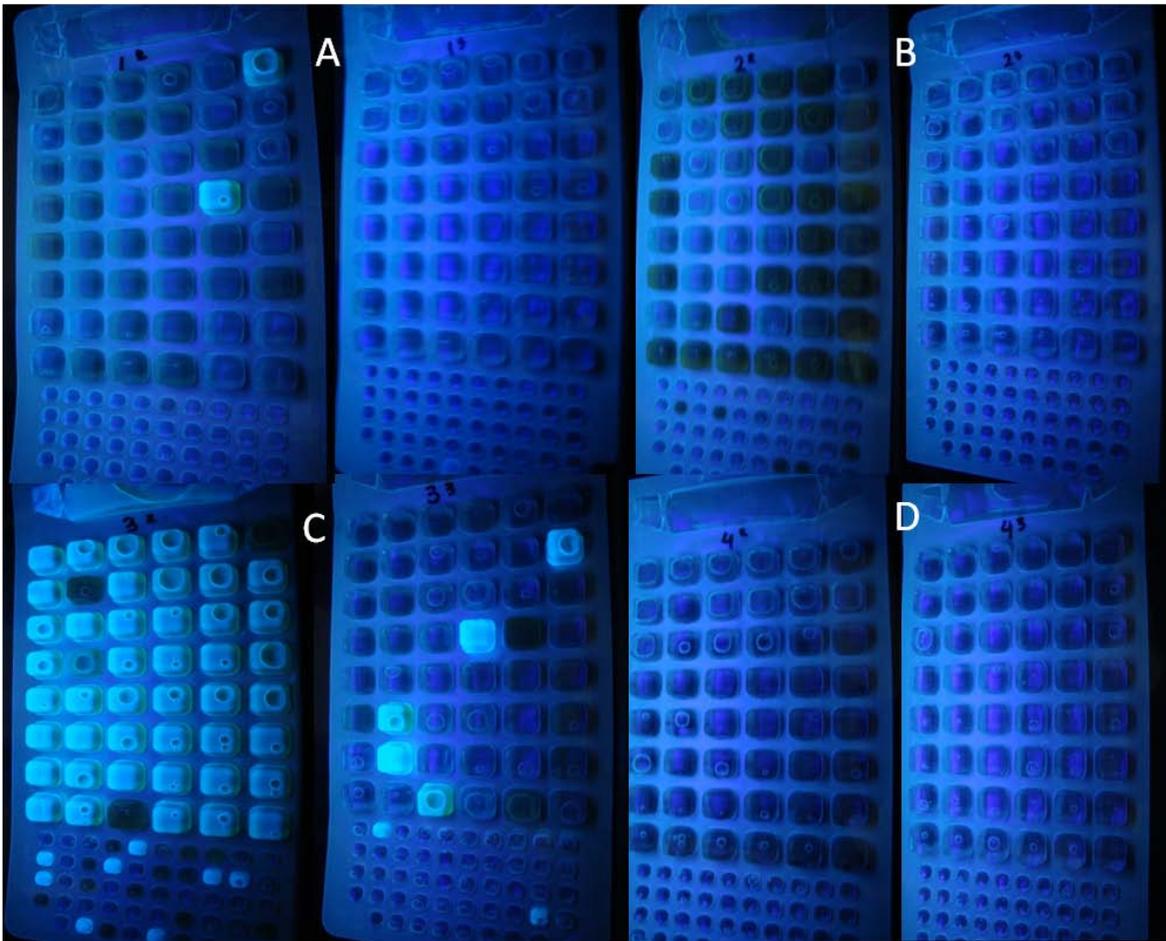


Figura 3. 4 Resultados para la presencia de *E. coli* utilizando el método Colilert. Las fosas fluorescentes son positivas para la presencia de *E. coli*. A .TC1, B. TC2, C. TC3 y D. TC.

3.4.3 Detección de la presencia de coliformes totales

El crecimiento de coliformes fue confirmado con el desarrollo de colonias color rojo y rosado en los tratamientos de BMC; TC 1, TC 2, y TC 3. En el tratamiento TC (turba 100%) no se observó crecimiento de bacterias coliformes ni *E. coli* coincidiendo el resultado al obtenido con la prueba Colilert®. De este modo es posible confirmar que las colonias fluorescentes que crecieron en las placas de MI no son *E. coli*.

La presencia de bacterias entéricas en el sustrato de BMC ha sido confirmada mediante las pruebas realizadas al sustrato coincidiendo con lo reportado en estudios previos (Tyler y Triplett, 2008). Las bacterias aisladas en este estudio fueron Gram negativas indicando su relación con las Enterobacterias las cuales resultan Gram negativas por el método de Tinción Gram (Boulter et al., 2002). Estas bacterias se clasifican como coliformes totales y son indicadoras de contaminación de acuerdo a la regulación 40 CFR- 503 (EPA, 2007) la cual rige los procesos de compostación de los biosólidos. De acuerdo con esta regulación el BMC analizado en esta investigación resultó ser clasificado como clase A por su contenido de coliformes totales en las muestras. En la regulación 40 CFR-503, el BMC clase A contiene con una cantidad de menos de 1,000 coliformes totales por gramo. Estudios sobre las poblaciones de bacterias coliformes en sustrato similar al BMC utilizando las pruebas BIOLOG® detectaron bacterias coliformes de los géneros: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Pseudomonas* en una gran diversidad de especies (Boulter et al., 2002).

3.4.3.1 Identificación de coliformes totales mediante pruebas BIOLOG®

La identificación de coliformes totales en el BMC fue realizada utilizando las pruebas de identificación BIOLOG®. Se identificaron en el tratamientos de BMC las bacterias, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Aeromonas encheleia*, *Escherichia fergusonii*, *Pasteurella bettyae*, *Rahnella aquatilis* en el TC1. En el TC2 *Pantoea stewartii subsp. stewartii* y en el TC3 *Vibrio tubiashii* y *R. aquatilis*.

Actinobacillus pleuropneumoniae es una bacteria patógena encontrada en el tracto respiratorio de cerdos provocando la enfermedad conocida como pleuropneumonia (Flores-Tena et al, 2007). *Aeromonas encheleia* es responsable de causar gastroenteritis y puede ser adquirida normalmente de ambientes domésticos (Demarta et al, 2000). *Escherichia fergusonii* causa infecciones intestinales y posee genes de patogenicidad similares a los de *E. coli* (Wragg et al., 2009). *Pantoea stewartii subsp. stewartii* es la causante de la marchitez bacteriana del maíz (Roper, 2011). *Pasteurella bettyae*, es común provocando infecciones genitourinarias y ha sido reportada también en casos de pleuroneumonía en humanos (Moritz et al., 1996). La especie de *Rahnella aquatilis* es aislada en muestras de agua y es parte de la flora microbiana intestinal humana (Fajardo y Bueno, 2000). Ésta puede desarrollarse como patógeno oportunista, presentándose generalmente en pacientes inmunocomprometidos (Fajardo y Bueno, 2000). *Vibrio tubiashii* es patógena de moluscos y ha sido encontrada en aguas del Pacífico en Norte América siendo la causante de importantes vibriosis (Elston et al., 2008).

Las bacterias coliformes pobladoras de sustratos como las compostas de biosólidos poseen mecanismos de resistencia a antibióticos superiores lo que las convierte en patógenos nocivos (Davin et al, 1997). Muchas de estas bacterias encontradas en el BMC han sido expuestas a antibióticos y poseen la capacidad de transmitir los genes de resistencia a bacterias comunes del suelo (Edrington et al., 2009). Uno de los mecanismos de resistencia es la hiperproducción de una cefalosporinasa codificada por el gen AmpC (Sanders, 1987). El otro es la resistencia a antibióticos β -lactámicos por la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Estas enzimas inicialmente se identificaron en *Klebsiella* spp. y en *E. coli* y están codificadas por plásmidos (Livermore, 1987). Las bacterias consideradas patógenos oportunistas se conjugan con patógenos como *E. coli*. aumentando su patogenicidad y resistencia (Livermore, 1987). Estudios por Cheng et al., (2008) confirman la diversidad bacteriana del BMC

identificando una gran cantidad de bacterias como clones no cultivables por lo que es posible que bacterias presentes en el sustrato no sean identificadas.

3.4.4 Detección de la presencia o ausencia de *Salmonella* spp.

En ninguno de los tratamientos analizados fue detectada la presencia de *Salmonella* spp., los tratamientos mostraron ausencia de *Salmonella* al ser comparadas con el control positivo que provee la prueba. De acuerdo al protocolo 3M™ TECRA™ *Salmonella* (2002) la prueba fue corrida exitosamente ya que el control positivo o indicador presentó una coloración rosada en la sección número 1 de la espátula. La sección número 4 de la espátula permaneció incolora resultando negativa para la presencia de *Salmonella* spp. La prueba TECRA *Salmonella* puede detectar de 1 a 5 células bacterianas en el medio de cultivo. De acuerdo con la regulación (40 CFR-503) (EPA, 2007) la densidad para la bacteria *Salmonella* en el BMC debe ser menor de tres NMP (número más probable) por 4 gramos de sólido.

Estudios previos realizados por Hussong et al., (1985) demuestran que la bacteria *Salmonella* spp. requiere condiciones específicas de temperatura, disponibilidad de nutrientes, humedad y pH en el sustrato para su recolonización luego de la compostación del sustrato. Compostas con valores de pH menores de 5.0 previenen el desarrollo de *Salmonella* spp. (Hussong et al., 1985). Estudios previos realizados en Puerto Rico por Vázquez, (2004) demostraron que el BMC posee valores de pH mayores de 6.0. La recolonización de la bacteria en el sustrato puede ser también afectada por la presencia de microorganismos antagonistas. *Salmonella* spp. no ha sido detectada en muestras de BMC que contengan altos niveles de coliformes (Hussong et al., 1985). De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación en las pruebas para la detección de coliformes las muestras de BMC analizadas poseen niveles altos de coliformes de hasta 922.2 NMP/100 ml. La competencia que ocurre en el sustrato debido a la acción microbiana previene el desarrollo de *Salmonella* (1,000:1) (Hussong et al., 1985). Las bacterias coliformes comunes de los biosólidos como *E. coli*,

Enterobacter aerogenes, *Enterococcus faecalis*, *Bacteroides ovatus* y *Fusobacterium variurn* tienen efecto antagonista sobre *Salmonella typhimurium* (Ushijima y Seto, 1991).

3.5 CONCLUSIONES

El uso del BMC como medio alternativo a la turba puede verse afectado por la presencia de *E.coli* y coliformes totales. Estos microorganismos patógenos representan un riesgo enmascarado a quienes manejan el sustrato. Por esta razón se recomienda la protección personal y un manejo adecuado durante la preparación de las mezclas utilizando este sustrato, al momento de la siembra y siempre que se vaya a utilizar el mismo. La protección personal debe consistir en el uso de guantes, mascarilla y gafas de seguridad, esta recomendación es a tenor con los hallazgos de la composición microbiana de este sustrato estudiado.

Los coliformes totales en el BMC son considerados patógenos oportunistas aún así deben ser considerados de alto riesgo. Estas bacterias pueden provocar graves complicaciones ya que generalmente presentan resistencia a antibióticos y suelen ser difíciles de detectar por el desconocimiento acerca de su patogenicidad. El uso de sustratos con altas poblaciones de microorganismos debe ser más estudiado y su uso debe ser restringido de acuerdo al tipo de cultivo. En estos casos deberían ser obligatorios realizar análisis microbianos como la detección e identificación de coliformes totales ya que cada lote de composta varía en el contenido microbiano. Es necesario que se establezcan medidas serias en la consideración y autorización de uso del sustrato a productores agrícolas. Las agencias pertinentes deben tomar acción en la regulación del uso del sustrato siendo conscientes del contenido microbiológico. Se recomienda no utilizar el BMC como medio de cultivo en la producción de cultivos alimenticios en particular cultivos que se consuman frescos. La ausencia de *Salmonella* spp. es un factor positivo a favor del BMC. Sin embargo, se recomienda realizar estudios similares de detección de *Salmonella* utilizando otros métodos. De este modo sería posible reconfirmar la ausencia total de *Salmonella* en el BMC.

3.6 LITERATURA CITADA

American Public Health Association. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater, 18th edition. American Public Health Association, Washington, D.C.

Boulter, J. I., J. T. Trevors y G. J. Boland. 2002. Microbial studies of compost: bacterial identification, and their potential for turfgrass pathogen suppression. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 18: 661–671.

Cheng, D. U., W.U. Zhenbin, X., Enrong, Z. Qiaohong, C. Shuiping, L. Wei, H. Feng. 2008. Bacterial diversity in activated sludge from a consecutively aerated submerged membrane bioreactor treating domestic wastewater. *Journal of Environmental Sciences* 20:1210–1217.

Davin-Regli, A., I. C. Bos, R. Charrel, E. Ageron, L. Papazian, P. A. D. Grimont., A. Cremieux y C. Bollet (1997). A nosocomial outbreak due to *Enterobacter cloacae* strains with the *E. hormaechei* genotype in patients treated with fluoroquinolones. *Journal of Clinical Microbiology*. 35(4): 1008–1010.

Demarta, A., M. Tonolla, A. Caminada, M. Beretta y R. Peduzzi. 2000. Epidemiological relationships between *Aeromonas* strains isolated from symptomatic children and household environments as determined by ribotyping. *European Journal of Epidemiology*. 16(5):447-453.

Edrington, T. S., W. E. Fox, T. R. Callaway, R.C. Anderson, D. W. Hoffman, D.J. Nisbet. 2009. Pathogen prevalence and influence of composted dairy manure application on antimicrobial resistance profiles of commensal soil bacteria. *Foodborne Pathogens and Disease*. 6:217-224.

Elston, R. A., H. Hasegawa, K. L. Humphrey, I. K. Polyak, C. C. Häse. 2008. Re-emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: severity, environmental drivers, geographic extent and management. *Diseases of Aquatic Organisms*. 82: 119–134.

Environmental Protection Agency, (EPA). 1992. Manual for the certification of laboratories analyzing drinking water: criteria and procedures, quality assurance, Third Edition. EPA-814B-92-002, Office of Ground Water and Drinking Water, Technical Support Division, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.

Environmental Protection Agency, (EPA). 1998. An analysis of composting as an environmental remediation technology. EPA 821-R-02-024, Capítulos 1 y 5: 1-3.

Environmental Protection Agency, (EPA). 2002. Method 1604: total coliforms and *Echerichia coli* in water by membrane filtration using a simultaneous detection

technique (MI Medium). EPA 821-R-02-024, Office of Water, Environmental Protection Agency, Washington DC.

Environmental Protection Agency, (EPA). 2007. Standards For The Use Or Disposal Of Sewage Sludge. Title 40: Protection of Environment (503):15-16.

Fajardo, M. y J. Bueno . 2000. Aislamiento de *Rahnella aquatilis* en el exudado de una traqueostomía en un paciente con cáncer de laringe. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica. 18(5): 251.

Flores-Tena, F. J., A. L. Guerrero-Barrera, F. J. Avelar-González, E. M. Ramírez-López y C. Martínez-Saldaña. 2007. Pathogenic and opportunistic Gram-negative bacteria in soil. Revista Latinoamericana Microbiología.49 (1-2): 25-30.

Guzmán C. y G. Campos. 2001. Indicadores de contaminación fecal en biosólidos aplicados en agricultura. Revista de la Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. 9: 59-67.

Hassen, A., K. Belguith, N. Jedidi, A. Cherif, M. Cherif y A. Boudabous. 2001. Microbial characterization during composting of municipal solid waste. Bioresource Technology. 80 (3):217-225.

Hussong, D., W. D. Burge y N. K. Enkiri.1985. Occurrence, growth, and suppression of salmonellae in composted sewage sludge. Applied and Environmental Microbiology. 50 (4):887-893.

Livermore, D.M. (1987). Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression on gram-negative rods. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases;6:439-45.

Meriaux, A., P. Pageau, Y. Cormier, N. Goyer y C. Duchaine. 2006. Bioaerosols in peat moss processing plants. Journal of Occupational and Environmental Hygiene. 3(8):408-17.

Moritz, F., E. Martin, J. F. Lemeland, G. Bonmarchand, J. Leroy y F. Escande. 1996. Fatal *Pasteurella bettyae* pleuropneumonia in a patient infected with human immunodeficiency virus. Clinical Infectious Disease. 22:592-3.

Pike, M. 2009. Identification of Possible Pathogens to Humans Present in the Municipal Sewage Sludge Compost. Proceedings Undergraduate Research Program 6 (1): 25-34.

Roper, M. C. 2011. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*: lessons learned from a xylem-dwelling pathogen of sweet corn. Molecular Plant Pathology. 12(7): 628–637.

Ryckeboer, J., J. Mergaert, J. Coosemans, K. Deprins y J. Swings. 2003. Microbiological aspects of biowaste during composting is monitored compost bin. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 127–137.

Sanders, C.C. (1987). Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer b-lactam antibiotics. *Annual Review Microbiology*. 41:573-93.

Tyler, H. L. y E. W. Triplett. 2008. Plants as a Habitat for Beneficial and or Human Pathogenic Bacteria. *Annual. Review. Phytopathology*. 46: 53-73.

Ushijima, T. y A. Seto. 1991. Selected faecal bacteria and nutrients essential for antagonism of *Salmonella typhimurium* in anaerobic continuous flow cultures. *Journal of Medical. Microbiology*. 35 :11 1-1 17.

Yanco, W. A. 1988 Occurrence of Pathogens in Distribution and Marketing Municipal Sludges. Research and Development Environmental Protection Agency, EPA/600/S1-871014.

Vásquez, J. C. 2004. *Absorción y lixiviación de Nitrógeno y Fosforo en sustrato a base de Biosólido Municipal Compostado*. Tesis, Universidad De Puerto Rico Recinto Universitario De Mayagüez.

Wragg, P. R.M. La Ragione, A. Best, R. Reichel, M.F. Anjum, M. Mafura y M.J. Woodward. 2009. Characterisation of *Escherichia fergusonii* isolates from farm animals using an *Escherichia coli* virulence gene array and tissue culture adherence assays. *Research in Veterinary Science*. 86 (1): 27–35.

4. DETECCIÓN DE COLIFORMES EN PLANTAS DE LECHUGA (*Lactuca sativa* var. Black Seeded Simpson) CRECIDAS EN EL BIOSÓLIDO MUNICIPAL COMPOSTADO Y LA TURBA

Grisselle E. Pérez Sánchez¹, Myrna Alameda Lozada² María Del Carmen Librán Salas² y Lydia Rivera Vargas²

¹ Estudiante Graduada y ² Catedráticas Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez.

4.1 RESUMEN

El Biosólido Municipal Compostado (BMC) es utilizado como enmienda en los suelos agrícolas y como medio de cultivo alternativo a la turba, proveyendo excelentes resultados en los cultivos. Sin embargo, su uso agrícola puede verse afectado por la presencia de microorganismos patógenos a humanos. Entre estas bacterias entéricas, como *Escherichia coli* y *Salmonella* spp., que poseen la capacidad de transportarse a través del interior de la planta y estar presentes en el tejido de cultivos comestibles como la lechuga (*Lactuca sativa*). Por tal razón, surge la necesidad de realizar esta investigación cuyo objetivo fue determinar la presencia o ausencia de bacterias coliformes, *E. coli* y *Salmonella* spp. en los tejidos de lechuga. Se analizaron tres tratamientos en los que se creció lechuga en BMC 100%, turba 100% y una mezcla de BMC y turba 25:75%. Los métodos utilizados en este estudio fueron filtración por membrana, la prueba Colilert® y TECRA *Salmonella*. Los resultados para estas pruebas confirmaron la presencia de coliformes en el tejido de la lechuga para todos los tratamientos estudiados. Sin embargo en este estudio no fue detectada la presencia de *E. coli* ni *Salmonella* spp. en la lechuga. En el tratamiento de la mezcla BMC y turba se cuantificó el mayor número de coliformes. Utilizando las pruebas BIOLOG® se identificaron las bacterias coliformes; *Enterobacter sakazakii* en las lechugas crecidas en BMC, *Pantoea dispersa* en las crecidas en la turba y *P. dispersa* y *Pseudomonas mendocina* en la mezcla de BMC y turba.

4.2 INTRODUCCIÓN

El Biosólido Municipal Compostado es utilizado como enmienda en los suelos agrícolas, por su alta capacidad de proveer nutrientes, mejorar la estructura del suelo y para la bioremediación (EPA, 1998). El BMC también es usado como un medio de cultivo alternativo a la turba en cultivos ornamentales (Cardona, 2008). Sin embargo existe escepticismo para la utilización como sustrato en los cultivos hortícolas por la posibilidad de contener bacterias coliformes (Yanco, 1988). Estudios realizados por Tyler y Triplett, (2008) demuestran que las bacterias entéricas de tipo coliformes como *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. son comunes colonizando el interior de las plantas. Éstas bacterias patógenas a humanos están asociadas a plantas como parte de su microflora nativa, ejemplo de esto ocurre en el musgo del género *Sphagnum* en el cual se han identificado las bacterias *Staphylococcus*, *Hafnia*, *Yersinia* y *Pantoea* (Tyler y Triplett, 2008). Este musgo es el componente principal de la turba comercial utilizada como medio de cultivo en plantas ornamentales y semilleros de cultivos hortícolas.

En los últimos años se ha observado la incidencia de bacterias patógenas contaminando vegetales como espinaca, tomate, alfalfa y lechuga entre otros causando epidemias y serios riesgos a la salud humana (Barak y Liang, 2008). De acuerdo con Tyler y Triplett, (2008) las bacterias patógenas más comunes en la contaminación de vegetales son *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Listeria monocytogenes*. La bacteria *Salmonella* spp. también es responsable de contaminación siendo un indicador de la presencia de patógenos humanos en los cultivos (Hussong et al., 1985). La aplicación de compostas a los suelos aumenta la densidad de poblaciones de coliformes fecales y *Salmonella* como la presencia de estos en los cultivos (Hussong et al., 1985). Por ejemplo, se ha encontrado que *E. coli* 0157:H7 y *Salmonella* enterica serovar *typhimurium* pueden sobrevivir unos 154 a 196 días y 203 a 231 días en el suelo respectivamente (Tyler y Triplett, 2008). Estudios en suelos enmendados con compostas también confirman la presencia de especies del género *Enterobacter* (Edrington et al., 2009).

Gagliardi y Karns, (2000) estudiaron el transporte de bacterias coliformes a través de las diferentes capas del suelo después de la aplicación del composta encontrándose a profundidades de 0.9 hasta 456 m de acuerdo el tipo de suelo. Estudios previos por Franz et al., (2007) en los que se cuantificó la capacidad de colonización de *E. coli* 0157:H7 y *Salmonella enterica* en lechuga reportaron la presencia de éstas en el tejido de la planta en densidades de 3.95 log ufc/g y 2.57 log ufc/g, respectivamente. Se ha probado que *Samonella* spp. es capaz de colonizar alfalfa durante las primeras 24 horas de germinación siendo persistente durante todo el ciclo de la planta (Howard y Hutchenson, 2003). La rápida capacidad de colonización de *Salmonella* spp. en los tejidos de los cultivos demuestra el riesgo de contaminación y peligro a la salud humana. Johannessen et al., (2005) reportaron que *E. coli* 0157:H7 no pudo ser detectada en suelos ni en los tejidos internos y externos de la lechuga, debido a la presencia de *Pseudomonas flourescens* en el suelo. *Pseudomonas flourescens* antagoniza *E. coli* 0157:H7 inhibiendo su desarrollo en el suelo y la colonización de los cultivos (Johannessen et al., 2005).

La presencia de microorganismos patógenos a humanos que pueden ser encontrados en las diferentes capas del suelo y en las plantas, representan un peligro inminente a la salud de quienes los ingieren como alimento o del personal que trabaja con el sustrato. Por tal razón, el objetivo de esta investigación fue determinar la presencia de *Salmonella* spp. *E. coli* y coliformes en plantas de lechuga crecidas en BMC, turba y una mezcla de BMC y turba en una proporción 25:75% (BMC:Turba). La evaluación de estos tratamientos permitirá recomendar el sustrato como medio de cultivo alternativo a la turba o como enmienda a suelos agrícolas, donde son producidos cultivos hortícolas destinados a la alimentación.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1 Detección de *E. coli* y coliformes totales en el tejido de lechuga

Se sembraron semillas de lechuga (*Lactuca sativa* var. Black Seeded Simpson) en bandejas de propagación en tres tratamientos conteniendo BMC 100% (TL 1), turba 100% (TL 2) y una mezcla de BMC y turba 25:75% (TL 3). Se seleccionó esta proporción basándonos en estudios previos con excelentes resultados utilizando plantas ornamentales (Cardona, 2004). Las semillas fueron sembradas el 14 de marzo de 2012, las muestras de lechuga fueron colectadas a los 40 días (DDS) de cultivo bajo condiciones de vivero. Las muestras de hoja fueron cortadas en la base del suelo evitando tocar el sustrato. Las muestras fueron desinfectadas superficialmente con una solución al 10% de hipoclorito de sodio y enjuagadas con agua destilada estéril por 3 veces. Las hojas fueron maceradas en un mortero estéril para extraer 10 ml de savia celular y éstos fueron diluidos en 90 ml de agua estéril (Johannessen et al., 2005). Las muestras fueron replicadas tres veces y colocadas en un agitador mecánico por 15 minutos. La dilución 10^{-2} se filtró utilizando filtros membrana de 47mm y un tamaño de poro de $45\mu\text{m}$ siguiendo el procedimiento descrito en la sección número 3.3.1 sobre la determinación de la presencia o ausencia de coliformes utilizado en este estudio. La presencia y el crecimiento de bacterias debió ser confirmada al observarse se coloración azul o fluorescencia en las colonias bajo luz ultravioleta (365nm). Se contaron las bacterias de cada plato para determinar el número de coliformes totales utilizando el método denominado como la Unidad Formadora de Colonias (UFC/100ml) (EPA, 2002). Se tomaron 3 colonias al azar de los coliformes totales que fueron transferidas a Tryptose Soy Agar (TSA) para su identificación utilizando las pruebas, BIOLOG® MicroLog 3-Microstation System (V.4.2) de Biolog, Inc. (Hayward, CA.) (Boulter et al., 2002). Este método se encuentra descrito en la sección 3.3.3.1 sobre la identificación de las bacterias mediante el método BIOLOG®.

4.3.1.1 Detección de *E. coli* y coliformes totales por el método Colilert®-18 (Quantitray-2000)

La prueba de Colilert®-18 (Quantitray-2000) (IDEXX Laboratories, Maine) fue utilizada para confirmar la presencia de *E. coli* y coliformes totales en los tratamientos analizados. Para esta detección se realizó la prueba de filtración por membrana la cual es descrita y recomendada en el Método 1604 de la Agencia de Protección Ambiental (EPA, 2002). Se utilizaron las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} (10:100 ml de agua) de cada uno de los tratamientos. Se siguieron las indicaciones de la prueba para la preparación de la muestra, la incubación y lectura de la misma. Las muestras que resultaran positivas mostrarían un color amarillo para la presencia de coliformes totales mientras que para *E. coli* mostraría fluorescencia bajo luz ultravioleta (365nm).

4.3.2 Detección de *Salmonella* spp. en el tejido de lechuga

De cada uno de los tratamientos evaluados en la detección de coliformes en cultivos hortícolas se tomaron muestras de 25 ml de savia celular que fueron inoculados en caldo nutritivo 3M™ TECRA™ UNIQUE. Se siguió el procedimiento descrito en la sección número 3.3.4 sobre la determinación de la presencia o ausencia de *Salmonella* spp. en el BMC realizado en esta investigación.

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1 Detección de *E. coli* y coliformes totales en el tejido de lechuga

La presencia de coliformes totales y la ausencia de *E. coli* fue confirmada con el método de filtración por membranas y la prueba Colilert® para los tres tratamientos analizados. Todos los tratamientos BMC 100%, turba 100% y la mezcla de BMC y turba 25:75% fueron positivos a la presencia de coliformes. En el método de filtración por membranas se observaron colonias fluorescentes bajo luz ultravioleta en el medio de cultivo MI (Fig. 4.2), siendo descritas como coliformes totales (EPA, 2002). En este análisis no se cuantificó el número de

colonias ya que sobrepasa el número a contabilizar. El método recomienda contar hasta un máximo de 200 colonias. Este resultado se reporta como TC⁺ (total coliforms), TNTC (too numerous to count or confluent). Utilizando la prueba Colilert® se confirmaron los resultados de la presencia de coliformes totales contabilizando sus poblaciones (Tabla 4.1). La presencia de coliformes es indicada por el cambio de color en la muestra, la cual obtiene un color amarillo (Fig. 4.3).

En el estudio de detección de coliformes realizado en esta investigación a los sustratos de BMC y la turba, los coliformes fueron encontrados en todos los tratamientos de BMC, no así en el tratamiento control el cual contenía 100% turba. En este análisis para la detección de coliformes en lechuga crecida en los sustratos antes mencionados bajo condiciones de vivero, fueron detectados coliformes en el tratamiento conteniendo 100% turba. En este tratamiento se observó un menor número de coliformes al compararlo con el de BMC y la mezcla BMC y turba (25:75%). En la lechuga sembrada en la mezcla de los sustratos se cuantificó el mayor número de coliformes. Este resultado está a tenor con lo reportado por Johannessen et al., (2005) quienes afirman que los microorganismos se activan bajo ciertas condiciones siendo así detectables. Esto puede explicar el aumento en poblaciones de coliformes en la lechuga crecida en la mezcla y la presencia de éstos en las plantas crecidas en la turba.

E. coli no fue detectada en ninguna de las dos pruebas realizadas a los tres tratamientos. En el medio de cultivo MI no se observaron colonias azules ni fluorescentes con tonalidades verdes que representaran *E. coli*. En la prueba Colilert® la muestra no mostró fluorescencia bajo luz ultravioleta siendo negativa a la presencia de la bacteria (Fig. 4.4). Johannessen et al., (2005) reportaron la capacidad de inhibición de *Pseudomonas putida* y *P. fluorescens* en la rizosfera de plantas de lechuga sobre *E. coli* O157:H7 bajo 25°C. Estas especies de *Pseudomonas* fueron encontradas por Cardona, (2008) en un estudio microbiológico del BMC. La presencia de estas bacterias con capacidad supresiva en las compostas explica el resultado de esta investigación en donde no se detectó la presencia de la bacteria *E. coli*. La capacidad de supresión de

microorganismos antagonistas varía con las condiciones ambientales y el tipo de suelo por lo que las bacterias patógenas tienen potencial de sobrevivir y representar un riesgo a los consumidores (Johannessen et al., 2005).

Tabla 4.1 Número más probable (NMP) de coliformes totales en el tejido de plantas de lechuga crecidas en BMC y turba

Tratamientos ¹	NMP/100ml
TL- 1 ²	3106.2
TL- 1 ³	66.3
TL- 2 ²	80.4
TL- 2 ³	<1
TL- 3 ²	4839.2
TL -3 ³	165

¹TL-1 BMC 100%, TL- 2 turba 100% y TL- 3 mezcla de BMC y turba (25:75%)

²Dilución 10⁻²

³Dilución 10⁻³

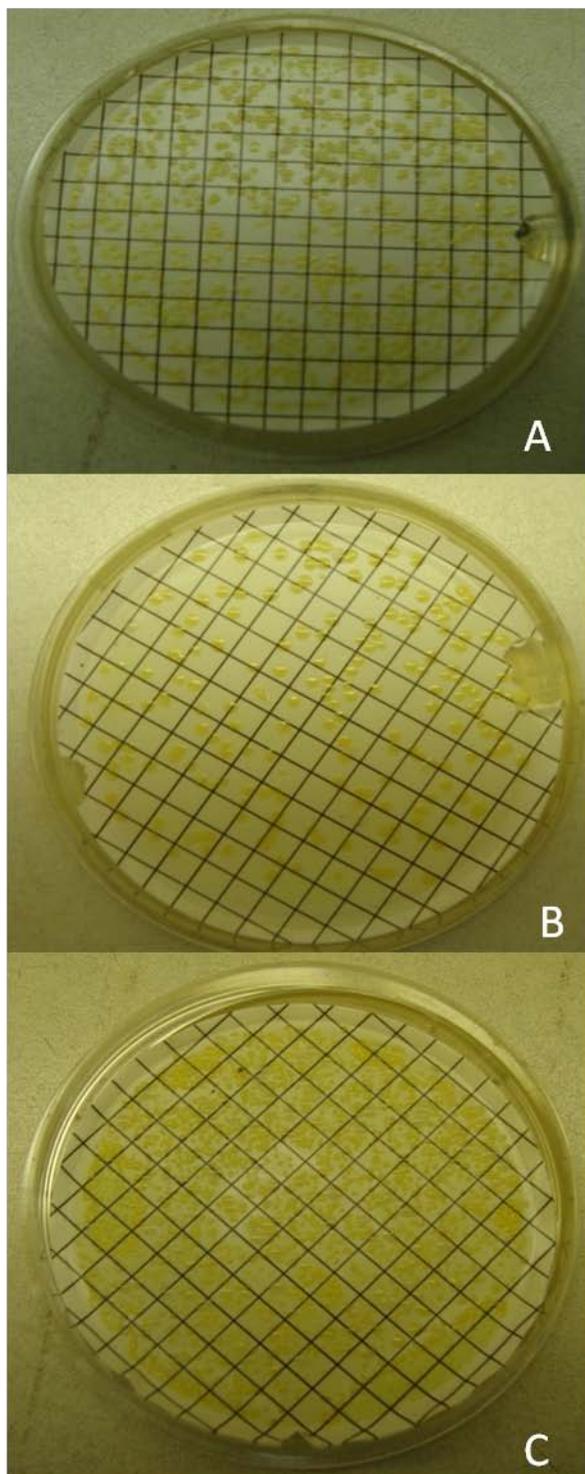


Figura 4. 1 Crecimiento en agar MI para los tratamientos de lechuga, bajo luz ambiente. No se observaron colonias azules que representaran la presencia de *E. coli*. A. TL-1 B. TL-2 y C. TL-3

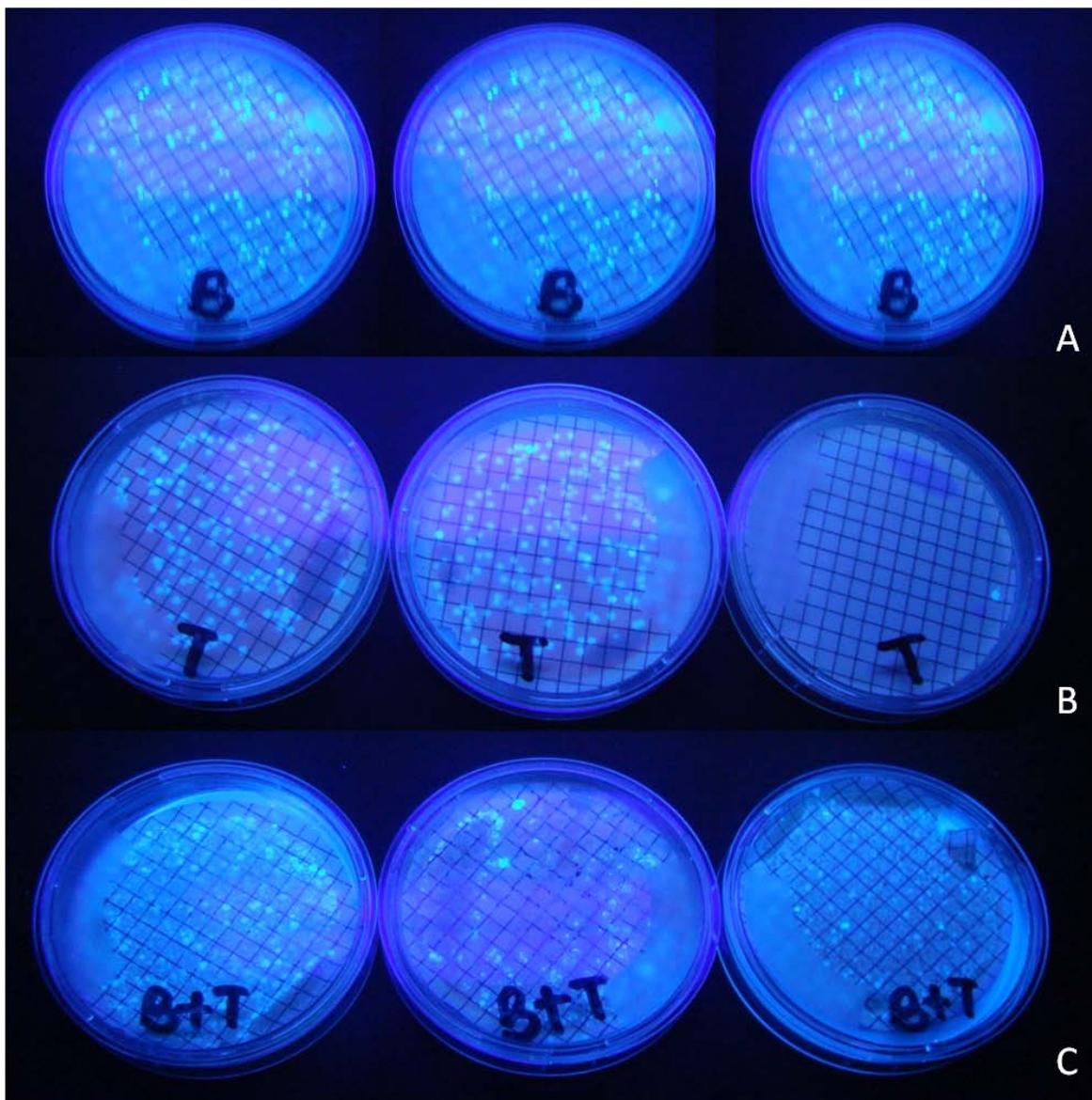


Figura 4.2 Crecimiento en agar MI para los tratamientos de lechuga, bajo luz ultravioleta en sus tres repeticiones. Las colonias con fluorescencia representan coliformes totales. A. TL-1 B. TL-2 y C. TL-3



Figura 4.3 Resultados positivos para la presencia de coliformes totales en lechuga. Las fosas mostraron coloración amarilla indicando presencia de coliformes totales en las muestras.
A. TL-1 B. TL-2 y C. TL-3

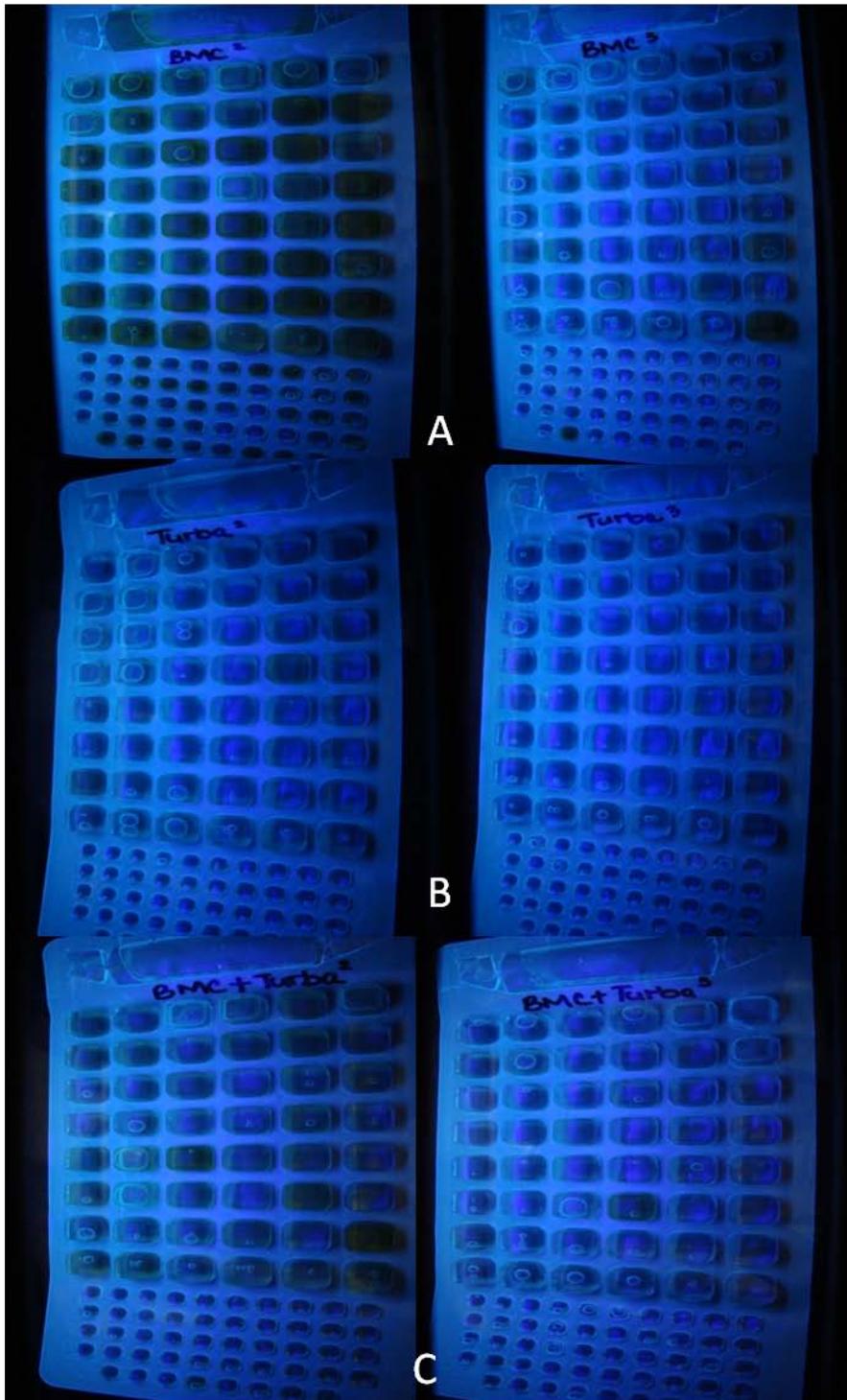


Figura 4. 4 Resultados negativos para la presencia de *E. coli* en lechuga. Las fosas no mostraron fluorescencia bajo luz ultravioleta. A. TL-1 B. TL-2 y C. TL-3

4.4.1.1 Identificación de coliformes totales presentes en el tejido de plantas de lechuga

La identificación de las bacterias coliformes encontradas en los tratamientos de BMC 100%, turba 100% y BMC y turba (25:75) fue realizada utilizando las pruebas BIOLOG®. En el tratamiento de BMC 100% se identificaron *Enterobacter sakazakii* en dos de las muestras y *Pseudomonas mendocina* en la misma cantidad. En la turba fue identificada *Pantoea dispersa*. Este hallazgo confirma lo reportado por Tyler y Triplett, (2008) quienes afirman que este género es parte de la microflora nativa del musgo *Sphagnum*. En la mezcla de BMC y turba se identificó la especie de *P. dispersa*, esta especie coincide con la encontrada en la turba.

Enterobacter sakazakii es un patógeno oportunista que se desarrolla en la fórmula de infantes. Esta es causante de meningitis y sepsis principalmente en neonatos e infantes que ingieren la fórmula (Townsend et al, 2008). La presencia de esta bacteria en los tejidos de la lechuga representa un alto riesgo a la salud humana. De igual modo implica un riesgo de contaminación a otros alimentos cuando éstos se manejan inadecuadamente. *Pantoea dispersa*, identificada en la lechuga crecida en la turba, fue descrita por primera vez en 1989 (Schmid et al, 2003). De acuerdo con reporte Schmid et al, (2003) esta bacteria no es considerada patógena ya que no ha sido reportada causando infecciones clínicas, sin embargo, recientemente se ha detectado en pacientes inmunocomprometidos. La bacteria es común en la rizosfera y superficie de plantas, en semillas de trigo como en biosólidos y lodos (Schmid et al, 2003). La presencia de esta bacteria en los tejidos de la lechuga presenta un potencial riesgo patogénico principalmente para pacientes inmunocomprometidos a pesar de que no existan muchos casos que la relacionen como un patógeno de alto riesgo. *Pantoea dispersa* ha sido reportada en el biocontrol de la enfermedad de la quemadura de la hoja en la caña de azúcar. Ésta presenta antagonismo contra *Xanthomonas albilineans* al producir fitotoxinas con efecto antibiótico (Zhang y Birch, 1997). *Pseudomonas mendocina* también identificada en el tejido de lechuga del tratamiento de BMC y turba fue aislada por primera vez en Argentina y comúnmente se encuentra en muestras de

agua y suelo (Aragone et al, 1992). Se ha reportado su presencia en la orina y úlceras y recientemente ha sido detectada en muestras de sangre en humanos (Aragone et al, 1992).

Las bacterias identificadas en el interior del tejido de lechuga no coinciden con las detectadas en el análisis al BMC. Éstas podrían ser coliformes que no fueron detectados en la turba, y que pudieron haber sido activados bajo condiciones y factores ambientales en el vivero de producción. Estudios previos por Millner, (1977) reportaron la presencia de *A. fumigatus* en el medio de cultivo de la turba después de estar expuesta a las condiciones ambientales en un vivero. El hongo no había sido detectado previamente en el sustrato antes de la siembra. Este comportamiento puede haber ocurrido con las bacterias permitiendo su desarrollo cuando el sustrato se encuentra en condiciones ideales para el crecimiento. La diversidad bacteriana del BMC es muy amplia y se pueden encontrar muchos clones bacterianos por lo que es posible que bacterias presentes en el sustrato no fueran identificadas (Cheng et al., 2008) en esta investigación. Por otro lado, la capacidad de transporte de los coliformes en las plantas puede sugerir que algunos de los coliformes detectados en la lechuga provengan del interior de las semillas de la planta (Johannessen et al., 2005).

4.4.2 Detección de *Salmonella* spp. en el tejido de lechuga

Salmonella spp. no fue detectada en los tejidos de lechuga. La prueba 3M™ TECRA™ UNIQUE realizada en los tres tratamientos resultó negativa, mostrándose incolora en la sección número 4 de la espátula que indica el resultado. La sección número 1 mostró la coloración rosada característica de que la prueba se realizó correctamente (Fig. 4.5). *Salmonella* spp. tampoco había sido detectada en los análisis realizados al BMC y a la turba en esta investigación. De acuerdo con Yanco, (1988) algunos sustratos de BMC no contienen niveles detectables de bacterias entéricas patógenas, sin embargo, éstas pueden estar presentes. Por este motivo es indispensable tomar en consideración la posible

presencia de estos microorganismos patógenos en los sustratos al utilizarlos en cultivos destinados a la alimentación.

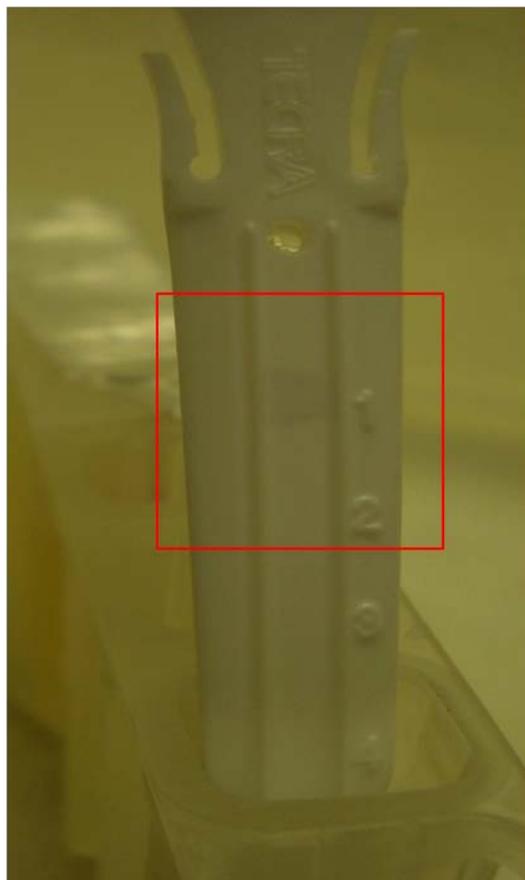


Figura 4. 5 Resultados de la Prueba TECRA *Salmonella* para las muestras de lechuga. La espátula mostró coloración en la sección número 1. Este resultado es negativo para la presencia de *Salmonella* spp.

4.5 CONCLUSIONES

La presencia de bacterias coliformes en los cultivos comestibles representa una restricción al uso de ciertos sustratos como el BMC. El biosólido municipal compostado por su contenido microbiológico patogénico no debe ser utilizado como medio de cultivo en productos alimenticios. Este sustrato es recomendado para cultivos ornamentales o cultivos hortícolas que no se consuman frescos, como ejemplos algunos farináceos. Es recomendable que se estudie el transporte de los coliformes en estos cultivos ya que se desconoce su capacidad de colonización. Por ser consumida la lechuga como vegetal fresco, no recomendamos el uso del BMC como medio de cultivo.

La capacidad de transporte de los coliformes a los tejidos de planta pone en riesgo la salud humana y animal ya que se desconoce la patogenicidad que poseen estas bacterias presentes en los sustratos. Es importante indicar que aunque *E. coli* y *Salmonella* spp. han sido responsables de graves epidemias a nivel mundial éstas no fueron detectadas en los tejidos de las plantas crecidas en este estudio. Este resultado favorece al BMC como un sustrato alternativo a la turba para plantas ornamentales.

4.6 LITERATURA CITADA

Aragone, M. D., D. M. Maurizi, L. F. Clara, J. L. Navarro y A. Ascione. 1992. *Pseudomonas mendocina*, an environmental bacterium isolated from a patient with human infective endocarditis. *Journal of Clinical Microbiology*. 30(6):1583-1584.

Barak, J.D. y A. S.Liang. (2008) Role of soil, crop debris, and a plant pathogen in *Salmonella enterica* contamination of tomato plants. *PLoS ONE*. 3(2): 1657.

Boulter, J. I., J. T. Trevors y G. J. Boland. 2002. Microbial studies of compost: bacterial identification, and their potential for turfgrass pathogen suppression. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 18: 661–671.

Cardona, L. I. 2008. *Efectos del biosólido municipal compostado como medio de cultivo alternativo a la turba utilizado en la producción de pascuas (Euphorbia pulcherrima Willd. ex Klotzsch)*. Tesis, Universidad De Puerto Rico Recinto Universitario de Mayagüez. pp 38- 45.

Cheng, D. U., W.U. Zhenbin, X.,Enrong, Z. Qiaohong, C. Shuiping, L. Wei, H. Feng. 2008. Bacterial diversity in activated sludge from a consecutively aerated submerged membrane bioreactor treating domestic wastewater. *Journal of Environmental Sciences* 20:1210–1217.

Edrington, T. S., W. E. Fox, T. R. Callaway, R.C. Anderson, D. W. Hoffman, D.J. Nisbet. 2009. Pathogen prevalence and influence of composted dairy manure application on antimicrobial resistance profiles of commensal soil bacteria. *Foodborne Pathogens and Disease*. 6:217-224.

Environmental Protection Agency (EPA). 1998. An analysis of composting as an environmental remediation technology. EPA 821-R-02-024, Capítulos 1 y 5: 1-3.

Environmental Protection Agency (EPA). 2002. Method 1604: total coliforms and *Echerichia coli* in water by membrane filtration using a simultaneous detection technique (MI Medium). EPA 821-R-02-024, Office of Water, Environmental Protection Agency, Washington DC.

Franz E., A. A. Visser, A. D. Van-Diepeningen, M. M. Klerks, A. J. Termorshuizen, A. H. C. Van-Bruggen. 2007. Quantification of contamination of lettuce by GFP-expressing *E. coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *Food Microbiol*. 24:106 -112.

Gagliardi J. V. y J. S. Karns. 2000. Leaching of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse soils under various agricultural management practices. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (3): 877–883.

Howard, M. B. y S.W Hutcheson. 2003. Grow dynamics of *Salmonella enteric* strains on alfalfa sprouts and in waste seed irrigation water. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:548-53.

Hussong, D., W. D. Burge y N. K. Enkiri. 1985. Occurrence, growth, and suppression of salmonellae in composted sewage sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. 50 (4):887-893.

Johannessen, G. S., G. S Bengtsson, B. T. Heier, S. Bredholt, Y. Wasteson y L. M. Rorvik. 2005. Potential Uptake of *Escherichia coli* O157:H7 from organic manure into crisphead lettuce. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(5): 5221–5225.

Millner, P. D, P. B Marsh, R. B Snowden y J. F. Parr 1977. Occurrence of *Aspergillus fumigatus* during composting of sewage sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. 34, (6): 765-772.

Schmid, H., C. Weber, J. R. Bogner y S. Schubert. 2003. Isolation of a *Pantoea dispersa*-Like Strain from a 71-year-old woman with acute myeloid leukemia and multiple myeloma. *Infection*. 31: 66-67.

Townsend, S., E. Hurrell y S. Forsythe. 2008. Virulence studies of *Enterobacter sakazakii* isolates associated with a neonatal intensive care unit outbreak. *BioMed Central Microbiology*. 8:64.

Tyler, H. L. y E. W. Triplett 2008. Plants as a habitat for beneficial and or human pathogenic bacteria. *Annual Review Phytopathology*. 46: 53-73.

Yanco, W. A. 1988 Occurrence of pathogens in distribution and marketing municipal sludges. Research and Development Environmental Protection Agency. EPA/600/S1-871014.

Zhang, L. y R. G. Birch. 1997. Mechanisms of biocontrol by *Pantoea dispersa* of sugar cane leaf scald disease caused by *Xanthomonas albilineans*. *Journal of Applied Microbiology*. 82(4):448-54.