

EFFECTO DEL VERMICOMPOSTAJE SOBRE LAS POBLACIONES DE *Colletotrichum acutatum* Y *Pectobacterium carotovorum* PRESENTES EN RESIDUOS DE PLANTAS

Lidieth Uribe¹*, Luis Felipe Arauz^{**}, Moisés Mata^{***}, Guiselle Meneses^{***}, Leida Castro^{*}

Palabras clave: *Colletotrichum acutatum*, *Pectobacterium carotovorum*, vermicompostaje, reducción de patógenos, residuos de plantas, *Eisenia foetida*.

Keywords: *Colletotrichum acutatum*, *Pectobacterium carotovorum*, vermicompost, pathogen reduction, plant residues, *Eisenia foetida*.

Recibido: 01/10/08

Aceptado: 11/01/09

RESUMEN

Se evaluó el efecto del vermicompostaje en la eliminación del hongo *Colletotrichum acutatum* presente en residuos del helecho hoja de cuero (*Rumohra adiantiformis*) y de la bacteria *Pectobacterium carotovorum* inoculada en residuos de papa (*Solanum tuberosum*). En ambos ensayos se utilizaron cajas de madera divididas en 3 compartimentos, en la sección central se colocó sustrato con lombrices (*Eisenia foetida*) y en las secciones laterales el material infectado respectivo. Los compartimentos se dividieron con mallas que permitieron el paso de las lombrices al tratamiento de vermicompostaje pero no al testigo. Se determinó la presencia de *C. acutatum* en los residuos de helecho mediante recuentos semanales de conidias durante 70 días. La población de *P. carotovorum* en los residuos de papa se evaluó utilizando la técnica de recuento en plato en medios específicos a los 26 y a los 41 días, y por la técnica de número más probable (NMP) al día 54. Si bien el número de esporas de *C. acutatum* disminuyó en ambos tratamientos, a partir del día 35, se observó una mayor reducción en el tratamiento con lombrices que en el tratamiento testigo. Hacia el final del experimento, el número de conidias se redujo 100 veces con respecto a la población original en el tratamiento vermicompostaje y 10 veces en el tratamiento testigo. En el caso de los desechos de

ABSTRACT

Effect of vermicomposting on pathogen populations present in crop residues. The effect of vermicomposting process on elimination of the fungus *Colletotrichum acutatum* present in leaf residues of leatherleaf fern (*Rumohra adiantiformis*) and the bacteria *Pectobacterium carotovorum* from infected potato (*Solanum tuberosum*) tubers was evaluated. In both assays, wood boxes divided in 3 compartments were used; the central section was filled with substrate containing earthworms (*Eisenia foetida*), and the lateral sections with the infected material. The compartments were separated with nets that allowed the earthworms to pass to the vermicomposting treatment but not to the control treatment. The presence of *C. acutatum* in the leaf residues was detected by weekly counts of conidia during 70 days. The population of *P. carotovorum* in the potato residues was evaluated using the viable cell count method in specific culture media at days 26 and 41, and by the Most Probable Number (NMP) technique at day 54. Although the number of *C. acutatum* spores was reduced in both treatments, after day 35, a greater reduction in the vermicomposting treatment than in the control was observed. At the end of the experiment the number of conidia was reduced 100 times compared to the original population in the vermicomposting treatment,

1 Autor para correspondencia. Correo electrónico: lidieth.uribe@ucr.ac.cr

* Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

** Centro de Investigación en Protección de Cultivos,

Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
*** Carrera de Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.

papa, al día 41 la disminución en la población de *P. carotovorum* fue 100 veces mayor en el tratamiento de vermicompostaje que en el control, no detectándose la bacteria al día 54 en el tratamiento con lombrices.

La reducción de las poblaciones de patógenos en el tratamiento de vermicompostaje se atribuye al efecto directo (degradación), e indirecto (cambios en pH, efecto cualitativo sobre poblaciones de microorganismos) que la lombriz roja ejerce sobre los residuos infectados.

INTRODUCCIÓN

El compostaje se puede utilizar para eliminar los residuos de cosecha y usar el compost en la fertilización del cultivo (Bollen et al. 1989, Coventry et al. 2005). El uso del compost obtenido a partir de residuos de cosecha requiere de la eliminación de los organismos fitopatógenos presentes en los mismos. La inactivación de patógenos durante el compostaje se ha atribuido a la alta temperatura, a la acción de microorganismos o a la degradación química (Downer et al. 2008). El vermicompostaje es una biotecnología que aprovecha las capacidades biológicas de las lombrices para el reciclaje de materiales orgánicos (Aranda et al. 1999, Bollo 1999), y puede ser una alternativa para el tratamiento de desechos contaminados con patógenos. La transformación de los residuos al ser ingeridos por la lombriz (Ferruzi 1994), la secreción de iones calcio que puede aumentar el pH del material (Infoagro 2008), así como las interacciones con la flora microbiana existente en el tracto de las lombrices (Furlong et al. 2002), puede provocar cambios en la población microbiana de los desechos, reduciendo la carga de patógenos (Eastman et al. 2001, Tiquia et al. 2002).

Si bien existe mucha literatura sobre supresión de enfermedades de plantas mediante la

and 10 times more than the control treatment. The population of *P. carotovorum* was reduced 100 times more in the potato residues subjected to vermicomposting than in the control after 41 days. *P. carotovorum* was not detected at day 54 in the earthworm treatment.

The reduction in the population of the pathogens in the vermicomposting treatment was attributed to the direct effect (degradation), and indirect effect (changes of the pH, qualitative effect on the microorganisms population) that *E. foetida* produced on the infected residues.

aplicación de vermicompost (Edwards y Arancon 2004), pocos trabajos han examinado la eliminación de organismos fitopatógenos en los desechos vegetales mediante el vermicompostaje. Kennel (1990), informa que la destrucción de hojarasca de cultivos frutales por lombrices de tierra (*Lumbricus terrestris*) reduce las poblaciones de patógenos que sobreviven en ella. Sin embargo, esto no garantiza la inocuidad del vermicomposte. Debe considerarse que a diferencia del compostaje tradicional, en el cual hay una etapa térmica que ayuda en la eliminación de patógenos (Bollen et al. 1989), en el vermicompostaje no se da este calentamiento por lo que la presencia de fitopatógenos en el residuo producido mediante este proceso debe examinarse.

Aunque existen trabajos que evalúan la reducción de patógenos humanos durante el proceso de vermicompostaje (Eastman et al. 2001, Tiquia et al. 2002, Prysor et al. 2006), en el caso de patógenos de plantas la información sobre su efecto es escasa y contradictoria. Algunos autores señalan que la población de bacterias presente en el vermicompost, es similar al sustrato que le dio origen (Toyota y Kimura 2000); con un incremento en el número de algunos grupos de bacterias luego de su paso por el intestino de la lombriz (Furlong et al. 2002). Por otro lado, las lombrices pueden ingerir especies de hongos selectivamente,

influenciar la germinación y dispersión de las esporas y crear microhábitats que pueden beneficiar o desfavorecer su desarrollo, pudiendo afectar así, el ataque de las enfermedades a las plantas (Edwards y Fletcher 1988, Brown 1995, Friberg et al. 2005).

A fin de evaluar el potencial del vermicompostaje como método de eliminación de patógenos de residuos de cosecha, se estudió su efecto sobre el hongo *Colletotrichum acutatum* presente en residuos de helecho hoja de cuero y sobre la bacteria *Pectobacterium carotovorum* (= *Erwinia carotovora*) en tubérculos de papa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Efecto del vermicompostaje sobre *Colletotrichum acutatum* en residuos de helecho

El experimento se realizó en un período de 70 días en el laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA). Los residuos de helecho hoja de cuero (*R. adiantiformis*) infectados naturalmente con el patógeno *C. acutatum*, se cortaron en secciones de aproximadamente 3 cm y se colocaron en sacos de fibra natural que se sumergieron durante 24 h dentro de un recipiente con agua, posteriormente se colocaron en los compartimentos laterales de 4 cajas de madera diseñadas para el experimento (Figura 1). En el compartimento central se ubicaron 15 l de sustrato que contenían aproximadamente 2200 lombrices (*E. foetida*). Se utilizaron lombrices procedentes del módulo Lechero del recinto de Turrialba, Sede del Atlántico de la Universidad de Costa Rica; las cuales se alimentaron durante 2 meses previos al experimento, con residuos de helecho libre de enfermedades. En cada uno de los compartimentos laterales se dispusieron 22,5 l de los residuos infectados. Las áreas fueron separadas con una malla que permitió el paso de las lombrices a una de las áreas (tratamiento de vermicompostaje) y no a la otra (tratamiento control) (Figura 1).

Las cajas se colocaron en el invernadero, se taparon y se cubrieron con bolsas de

plástico negras. Se adicionó agua del tubo 3 veces por semana a fin de mantener las condiciones necesarias para el proceso de vermicompostaje (Wharton y Diéguez 2004).

Recuento de conidios de *C. acutatum*

De cada uno de los compartimentos laterales de las 4 cajas se tomó una muestra compuesta de 10 g de material, estas muestras se colocaron en bolsas estériles y se diluyeron 1:10 con agua estéril en las primeras evaluaciones y 1:5 en las evaluaciones hechas a partir del día 29, las bolsas se colocaron en un procesador de muestras "Stomacher 400 Circulator" y se trataron a 300 rpm durante 1 min, una alícuota de la muestra se tiñó con azul de lactofenol, y se realizó el recuento de conidias, utilizando una cámara de Neubauer para observar la preparación con un aumento de 200X. El número de conidias por mililitro de cada muestra se calculó utilizando la siguiente fórmula: Dilución x [10.000 (# células.g⁻¹)] = # células.ml⁻¹. También se evaluó, por medio de recuentos en plato, las poblaciones de bacterias, levaduras y hongos a los 21 y 70 días, para tal fin, diluciones seriadas del material se inocularon en platos de los medios de cultivo agar albuminato, agar papa dextrosa acidificado (PDA) y extracto de malta (Wollum 1982, Lorch et al. 1995).

Análisis químicos

Se determinó el contenido de N y C y la tasa C/N de los residuos en descomposición a los 35 y 70 días de iniciado el experimento, en el Laboratorio de Suelos del CIA mediante técnicas convencionales (Bremner y Tabatabai 1971, Walkley y Black 1938). Se determinó además el pH de los residuos a una dilución 1:10 en agua, los días 14 y 35.

Identificación del patógeno

La especie patogénica presente en los residuos de helecho utilizados fue identificada con base en síntomas y observaciones morfológicas al microscopio, dicha identificación fue corroborada en el Laboratorio de Biotecnología del CIA

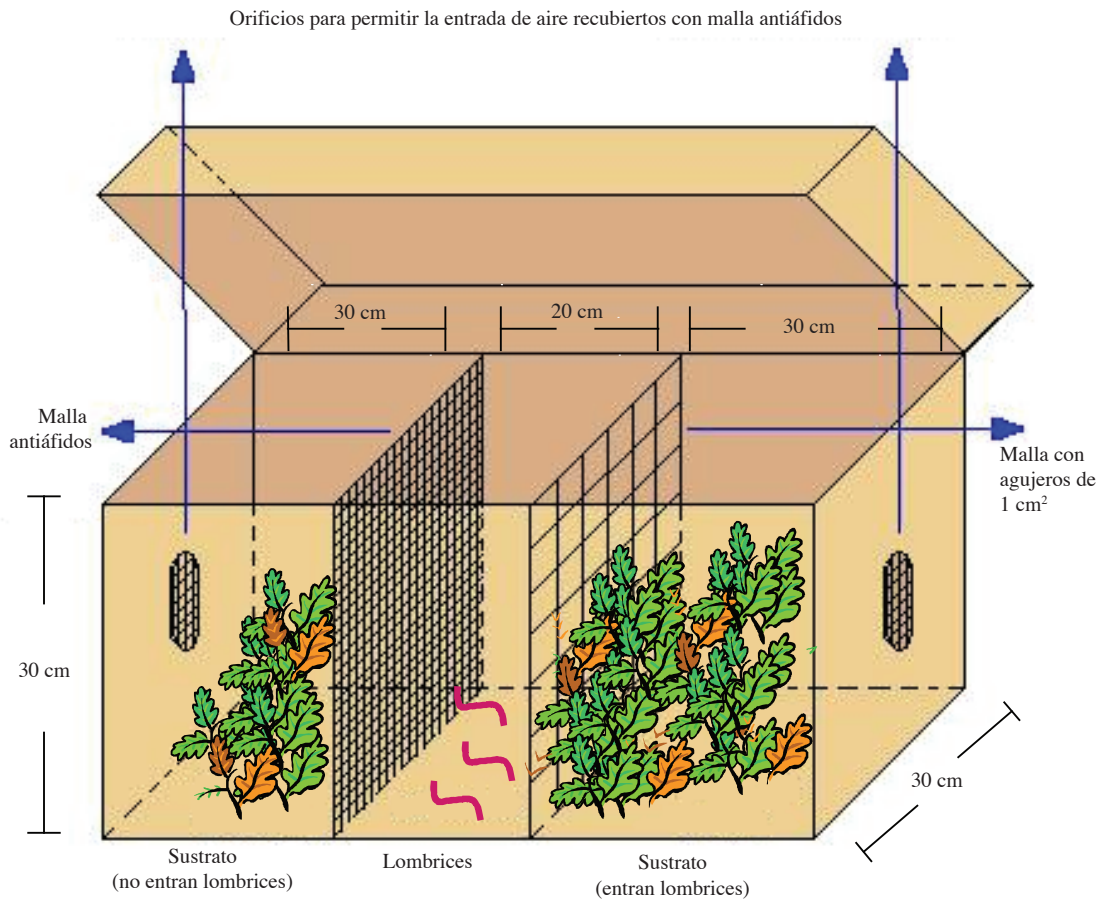


Fig. 1. Diseño de las cajas utilizadas para el vermicompostaje de desechos de helecho (*R. adiantiformis*) infectado con *C. acutatum*, y desechos de papa infectados con *Pectobacterium*.

mediante la amplificación del ADN fúngico con un PCR específico de la región ribosómica ITS, utilizando los iniciadores CACUT e ITS3. Los fragmentos de amplificación, con sus respectivos controles positivo y negativo, fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1,6%, seguido por tinción con bromuro de etidio y exposición a luz UV, según criterios previamente descritos por Schiller et al. (2006).

Efecto del vermicompostaje sobre *Pectobacterium carotovorum*

El experimento se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola del CIA durante un período de 53 días. Se determinó el efecto del vermicompostaje sobre la eliminación de *P. carotovorum* de residuos de papa utilizando el mismo sistema empleado en la sección anterior;

previamente, las papas fueron inoculadas en el laboratorio con una suspensión de 3×10^9 ufc.ml⁻¹ de *P. carotovorum*, procedente de la colección de cepas de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica. Las papas se partieron a la mitad y se inocularon con 100 ul de la suspensión, se incubaron durante 96 h en bolsas plásticas negras a temperatura ambiente y con papel toalla húmedo para mantener la humedad y permitir su infección. Posteriormente, se distribuyó el contenido de la bolsa en las secciones laterales de los cajones y en el compartimento central se aplicó 10,2 l de un sustrato que contenía aproximadamente 3000 lombrices.

Análisis microbiológicos

De cada uno de los compartimentos laterales de las 4 cajas se tomó una muestra compuesta de 10 g de material, estas muestras se colocaron en bolsas estériles y se diluyeron 1:4,5 con agua destilada estéril, las bolsas se colocaron en un procesador de muestras "Stomacher 400 Circulator" y se procesaron a 300 rpm durante 1 min. Por medio de recuentos en plato se evaluó las poblaciones de bacterias, levaduras, y hongos a los 26 y 41 días. Para ello se hicieron diluciones seriadas (1:10) del material y se inocularon platos de los medios de agar albuminato, extracto de malta y PDA acidificado (Wollum 1982, Lorch et al. 1995). Para la determinación de *Pectobacterium* se utilizó el medio YDC y para su identificación se le realizó, a colonias características de esta bacteria, las pruebas bioquímicas TSI, indol, oxidasa y crecimiento en medio Mc Conkey (De Boer and Kelman 2001, Rodríguez et al. 2005); se confirmó su identificación utilizando el método Biolog (Biolog, Inc., Hayward, CA). El día 53, se determinó el número más probable (NMP) de *P. carotovorum*, muestras (según tratamiento y repetición), de aproximadamente 20 g se colocaron en bolsas estériles, las muestras se diluyeron 1:4,5 con agua destilada estéril, se colocaron en un procesador de muestras "Stomacher 400 Circulator" y se procesaron a 300 rpm durante 1 min. A partir de cada suspensión se hicieron diluciones seriadas (1:10), se inoculó 100 ul de cada

dilución en series de 5 tubos eppendorf que contenían una sección de aproximadamente 1 cm² de papa, desinfectada previamente con NaOCl al 4% durante 2 min. Todos los tubos que presentaron pectólisis se subcultivaron en YDC, a las colonias típicas de cada uno de los tratamientos que dieron positivo, se les realizaron las pruebas de TSI, indol, oxidasa, crecimiento en medio Mc Conkey (De Boer and Kelman 2001, Rodríguez et al. 2005), se confirmó su identificación utilizando el método Biolog (Biolog, Inc., Hayward, CA).

Análisis estadístico

El experimento tuvo un diseño de bloques completos al azar, con 4 repeticiones. Los datos de poblaciones de bacterias se transformaron utilizando el logaritmo del número de unidades formadoras de colonias. A todas las variables se les realizó un análisis de varianza. La comparación de medias se realizó utilizando LSD Fisher ($p=0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación del patógeno

El primer paso en el diseño de este trabajo fue la identificación de patógeno que se encontraba afectando al helecho; el cual resultó ser *Colletotrichum acutatum*. La identificación se realizó con evaluaciones de los síntomas y observaciones morfológicas al microscopio; y la corroboración se llevó cabo mediante un análisis del ADN fúngico con un PCR específico de la especie de la región ribosómica ITS.

Eliminación del patógeno *C. acutatum* de residuos de helecho contaminados

La población original de conidios de *C. acutatum* en los residuos de helecho fue de $1,7 \times 10^5$ en el testigo y de $1,6 \times 10^5$ en el material sometido a vermicompostaje. Durante las 2 primeras semanas del experimento se observó una disminución en el número de conidias del hongo, tanto en el tratamiento control como en

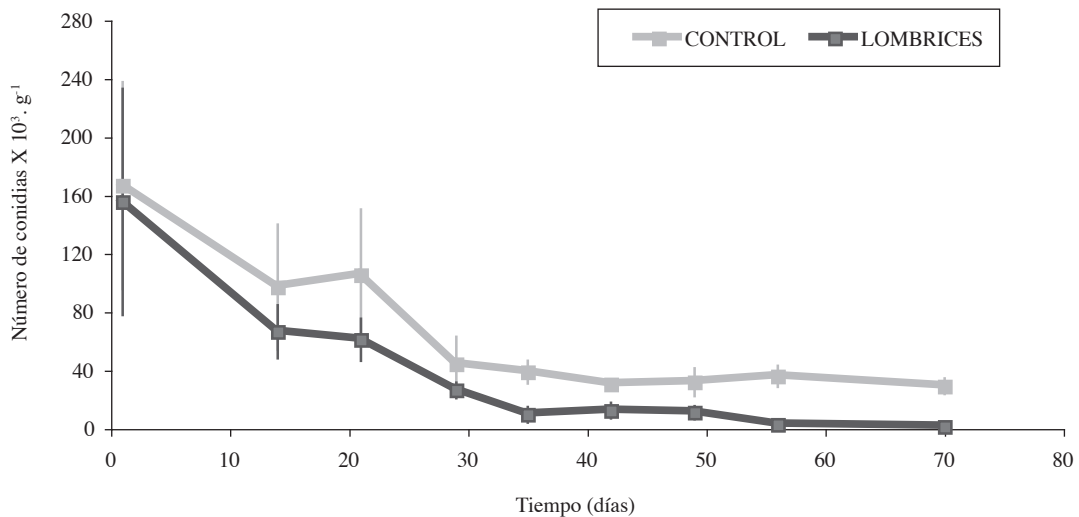


Fig. 2. Efecto del vermicompostaje sobre el número de conidias de *C. acutatum* a través del tiempo. Las barras representan 1 desviación standard.

el vermicompostaje (Figura 2). El cambio en las condiciones ambientales a las que se sometió el hongo patógeno, cuando los residuos secos se humedecieron y se colocaron en las cajas; así como los procesos normales de descomposición, pudieron causar este efecto. Los resultados concuerdan con lo observado en estudios de sobrevivencia de *C. acutatum* en residuos de fresa (Eastburn y Gubler 1992), y de helecho (Norman y Strandberg 1997); estos autores encontraron que la sobrevivencia de conidias en desechos infectados declinó rápidamente al aumentarse la humedad. Norman y Strandberg (1997) señalan que en los residuos secos, el hongo permaneció viable hasta un año después a pesar de haber sido incorporados en el suelo.

A partir del día 35 la reducción observada en el número de conidias en el tratamiento con lombrices fue mayor que la obtenida en el control (Figura 2), después del día 42 el número de conidias se mantuvo relativamente constante en el tratamiento control en 3×10^4 conidias.g⁻¹, y hacia el final del experimento el número de esporas fue de $2,9 \times 10^4$ conidias.g⁻¹, 10 veces menor que la población original. La reducción en el número de

conidias en el tratamiento de vermicompost fue de 100 veces con respecto a la población original, obteniéndose una población final de $1,4 \times 10^3$ conidias.g⁻¹. Norman y Strandberg (1997) indican que se requieren al menos 100 conidias.ml⁻¹ de *C. acutatum* de residuos para infectar y colonizar las hojas de helecho.

Cuando se evaluó el área bajo la curva (Cuadro 1), se observó una mayor disminución del número de conidias de *C. acutatum* con el paso del tiempo, en el tratamiento de vermicompostaje, comparado con el obtenido en el tratamiento control (Cuadro 1).

Cuadro 1. Efecto de los tratamientos sobre el área bajo la curva de disminución del número de conidias de *C. acutatum*.

Tratamiento	Área bajo la curva
Vermicompostaje	466 a
Control	798 b

Números con diferente letra implican diferencias significativas $p < 0,05$. Según LSD Fisher.

La reducción observada en el control puede atribuirse en parte a factores bióticos, como microorganismos que pueden afectar en forma negativa las conidias por parasitismo o depredación (Edwards y Fletcher 1988, Brown 1995). En ambos tratamientos se encontraron altas poblaciones de microorganismos (Cuadro 2) siendo mayor la cantidad de bacterias que las de hongos y levaduras. Hacia el final del experimento hubo un número significativamente mayor de bacterias en el control comparado con el tratamiento de vermicompostaje (Cuadro 3). Probablemente, en ausencia de las lombrices, la descomposición fue más lenta, por lo que materiales fácilmente degradables presentes en el control, pudieron haber permitido una mayor cantidad de bacterias (Paul y Clark 1996), en este tratamiento que en el de vermicompostaje. Además, visualmente se pudo notar como, especialmente en las últimas 2 semanas, el material vegetal del compartimiento

Cuadro 2. Efecto del vermicompostaje sobre la población de bacterias, hongos y levaduras presentes en residuos de helecho (*R. adiantiformis*) infectados con *C. acutatum*. Día 21.

Tratamiento	Bacterias	Hongos ufc.g ⁻¹	Levaduras
Vermicompostaje	5,4X10 ⁸ a	3,4X10 ⁶ a	2,1X10 ⁷ a
Control	4,8X10 ⁸ a	2,7X10 ⁶ a	1,8X10 ⁷ a

Letras diferentes en la misma columna implican diferencias significativas según LSD ($p < 0,05$).

Cuadro 3. Efecto del vermicompostaje sobre la población de bacterias, hongos y levaduras presentes en residuos de helecho (*R. adiantiformis*) infectados con *Coletotrichum acutatum*. Día 70.

Tratamiento	Bacterias	Hongos ufc.g ⁻¹	Levaduras
Vermicompostaje	1,6X10 ⁸ a	5,5X10 ⁶ a	7,3X10 ⁶ a
Control	1,2X10 ⁹ b	4,9X10 ⁶ a	1,5X10 ⁷ a

Letras diferentes en la misma columna implican diferencias significativas según LSD ($p < 0,05$).

al que tenían acceso las lombrices tomaba un aspecto diferente al del control, pues en este último las hojas se observaban más enteras, mientras que en el que podía ser accesado por lombrices el material se veía más desmenuzado y con materia oscura similar a humus.

La mayor disminución en la cantidad de conidias en el tratamiento de vermicompostaje (Cuadro 1) se puede atribuir al efecto de la actividad de las lombrices sobre el sustrato. Por un lado, mediante la degradación directa que las lombrices producen al alimentarse de las conidias (Friberg et al. 2005), y en menor medida a cambios del pH. Si bien el pH disminuyó a través del tiempo en ambos tratamientos, producto de la descomposición de residuos de helecho (Cuadro 4), esta reducción fue ligeramente mayor en el tratamiento control comparado con el tratamiento de vermicompostaje, se sabe que las lombrices favorecen la liberación de iones calcio que pueden basificar el medio, esta producción está a cargo de las glándulas calcíferas ubicadas en el sistema digestivo de la lombriz (Infoagro 2008). Otro factor que podría explicar la mayor disminución en el número de conidias, en el tratamiento con lombrices, es la acción de una flora microbiana cualitativamente diferente presente en estos tratamientos, ya que factores como la tasa C/N, humedad, número de microorganismos fueron similares en ambos tratamientos.

Con respecto al contenido de C y N de los residuos, estos no variaron con respecto al material original, donde el contenido de N fue de 1,8%, el de C 36,2% y la tasa C/N fue de 19,9. Estos valores se mantuvieron similares en ambos tratamientos a través del tiempo hasta el final

Cuadro 4. Efecto de los tratamientos sobre el pH de los residuos de helecho (*R. adiantiformis*).

Tratamiento	Día 14	Día 35
Vermicompostaje	6,8 a	6,2 a
Control	6,8 a	6,0 b

Letras diferentes en la misma columna implican diferencias significativas según LSD ($p < 0,05$).

del experimento (Cuadro 5), lo que indica que el material utilizado se descompone lentamente. Así mismo, el porcentaje de humedad se mantuvo alrededor del 60% en ambos tratamientos.

Según los datos obtenidos en esta investigación los residuos de helecho deberían, antes de iniciar el proceso de vermicompostaje, mezclarse con residuos que contengan una menor relación C/N de manera que se favorezca la descomposición y por lo tanto la reducción del inóculo de *C. acutatum*, hasta niveles aceptables. Estos resultados son importantes si consideramos que *C. acutatum* ocasiona pérdidas severas en cultivos de importancia comercial como el helecho hoja de cuero (Norman y Strandberg 1997, Arauz 1998). La enfermedad se difunde rápidamente (Norman y Strandberg 1997) por lo que en Costa Rica constituye un problema grave pues existe una gran cantidad de pequeñas y medianas empresas que se dedican a la producción y exportación del follaje de este importante cultivo (Bertsch 2004). Es por ello que el tratamiento adecuado de los residuos contaminados se hace indispensable.

Eliminación de *Pectobacterium carotovorum* en papas infectadas con el patógeno

Las poblaciones de *P. carotovorum* fueron, al día 26 de iniciado el experimento, similares en el control y en el tratamiento sometido al vermicompostaje. Hacia el día 41, se observó en el tratamiento con vermicompostaje una reducción en el número de *P. carotovorum* de al menos 100 veces con respecto al muestreo anterior (Cuadro 6), en ese momento la población de *Pectobacterium* fue menor de 10^6 bacterias.g⁻¹. La población total de bacterias presente en los residuos infectados fue similar en el control y el vermicompostaje en los 2 muestreos.

Hacia el día 53 del experimento, la población de *P. carotovorum* en el tratamiento de vermicompostaje se redujo a menos de 1,8 NMP.g⁻¹ mientras que en el control, se encontró una cantidad de 653 bacterias.g⁻¹ (Cuadro 7).

Tanto en el tratamiento control como en el de vermicompostaje se observó una alta población de microorganismos (Cuadros 8 y 9), que

Cuadro 5. Contenido de N, C y tasa C/N en residuos de helecho (*R. adiantiformis*) sometidos a diferentes tratamientos.

Tratamiento	N (%)		C (%)		C/N	
	Día 35	Día 70	Día 35	Día 70	Día 35	Día 70
Vermicompostaje	1,9 a	1,9 a	37,1 a	36,4 a	19,5 a	19,0 a
Control	1,9 a	1,9 a	35,8 a	37,7 a	18,6 a	20,2 a

Letras diferentes en la misma columna implican diferencias significativas según LSD (p<0,05).

Cuadro 6. Efecto del vermicompostaje sobre las poblaciones de *P. carotovorum* en residuos de papa infectados.

Tratamiento	Día 26		Día 41	
	<i>P. carotovorum</i>	Bacterias	<i>P. carotovorum</i>	Bacterias
	ufc.g ⁻¹			
Vermicompostaje	1,2X10 ⁹ a	8,2X10 ⁹ a	<1X10 ⁶	1,1X10 ¹⁰ a
Control	1,7X10 ⁹ a	1,3X10 ¹⁰ a	2,5X10 ⁹	1,1X10 ¹⁰ a

Letras diferentes en la misma columna implican diferencias significativas según LSD (p<0,05).

Cuadro 7. Efecto del vermicompostaje en el número más probable de *P. carotovorum*. Día 53.

Tratamiento	NMP <i>Pectobacterium.g</i> ⁻¹
Vermicompostaje	<1,8
Control	653

Cuadro 8. Efecto del vermicompostaje sobre la población de bacterias, hongos y levaduras presentes en residuos de helecho (*R. adiantiformis*) infectados con *P. carotovorum*. Día 41.

Tratamiento	Bacterias	Hongos ufc.g ⁻¹	Levaduras
Vermicompostaje	1,1X10 ¹⁰ a	2,8X10 ⁸ a	3,5X10 ⁹ a
Control	1,1X10 ¹⁰ a	1,1X10 ⁹ a	3,1X10 ⁹ a

Letras diferentes en la misma columna implican diferencias significativas según LSD ($p < 0,05$).

Cuadro 9. Efecto del vermicompostaje sobre la población de bacterias, hongos y levaduras presentes en residuos de helecho (*R. adiantiformis*) infectados con *P. carotovorum*. Día 70.

Tratamiento	Bacterias	Hongos ufc.g ⁻¹	Levaduras
Vermicompostaje	3,1X10 ⁹ a	1,6X10 ⁸ a	8,3X10 ⁸ a
Control	2,2X10 ⁹ a	8,3X10 ⁸ a	1,4X10 ⁹ a

Letras diferentes en la misma columna implican diferencias significativas según LSD ($p < 0,05$).

Cuadro 10. Efecto del vermicompostaje sobre el pH de los residuos de helecho (*R. adiantiformis*).

Tratamiento	Día 26	Día 41	Día 54
Vermicompostaje	6,4 a	7,4 a	7,2 a
Control	6,2 a	6,9 b	6,7 b

Letras diferentes en la misma fila columna implican diferencias significativas según LSD ($p < 0,05$).

contribuyeron probablemente a la reducción del patógeno.

En el cuadro 10 se observa el efecto del tratamiento sobre el pH de los residuos. A los 26 días de iniciado el experimento el pH fue similar en ambos tratamientos; sin embargo, a los 41 y 54 días el pH fue significativamente mayor en el tratamiento que contiene lombrices. Estas diferencias en el pH podrían cambiar cualitativamente las poblaciones de microorganismos en los 2 tratamientos, afectando las poblaciones del patógeno de forma diferente.

La reducción en el contenido de carbono orgánico tendió a ser mayor en los tratamientos con vermicompostaje, denotando una mayor descomposición de los residuos en dicho tratamiento (Cuadro 11).

Cuadro 11. Contenido de C orgánico en desechos de papa infectados con *P. carotovorum*.

Tratamiento	Día 26	Día 41 %C	Día 53
Vermicompostaje	31 a	23 a	24 a
Control	28 a	26 a	26 a

Letras diferentes en la misma columna implican diferencias significativas según LSD ($p < 0,05$).

La reducción observada de las poblaciones de *C. acutatum* y *P. carotovorum*, en el tratamiento de vermicompostaje, con respecto al control, se puede atribuir al efecto directo del proceso (degradación) o indirecto (cambios en pH, cambios en la población y actividad de los microorganismos presentes en los desechos) que la lombriz roja (*E. foetida*) ejerce sobre los desechos infectados con los patógenos, ya que el número de bacterias, hongos y levaduras fue similar en ambos tratamientos.

CONCLUSIONES

El proceso de vermicompostaje reduce la población de patógenos presente en el material

contaminado, pero no necesariamente elimina todos los patógenos presentes.

AGRADECIMIENTOS

A David García Gómez del Laboratorio de Biotecnología de Plantas del CIA por la identificación molecular de *Colletotrichum acutatum*.

Esta investigación fue realizada con financiamiento de los proyectos 230-04-FI del Fondo de Incentivos del CONICIT y VI 733-A5-008 de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

LITERATURA CITADA

- ARANDA E., BAROIS I., ARELLANO P., IRISSON S., SALAZAR T., RODRÍGUEZ J., PATRÓN J.C. 1999. Vermicomposting in the tropics, pp. 253-287. In: P. Lavelle, L. Brussaard, P. Hendrix (eds). Earthworm management in tropical agroecosystems. CAB International.
- ARAUZ L.F. 1998. Fitopatología un enfoque agroecológico. Editorial de la Universidad de Costa Rica, San José, C.R. 467 p.
- BERTSCH F. 2004. El recurso suelo en Costa Rica. X Informe sobre el estado de la Nación en Desarrollo Humano Sostenible. Consejo Nacional de Rectores, La Defensoría de los Habitantes. 40 p.
- BOLLEN G.J., VOLKER D., WIJNEN A.P. 1989. Inactivation of soil-borne plant pathogens during small scale composting of crop residues. The Netherlands. Journal of Plant Pathology 95 Supplement 1:19-30.
- BOLLO E. 1999. Lombricultura. Una alternativa de reciclaje. Soboc, Grafic. Ecuador 149 p.
- BREMNER J.M., TABATABAI M.A. 1971. Use of automated combustion techniques for total carbon, total nitrogen and total sulphur analysis of soil, pp. 1-16. In: L.M. Walsh (ed). Instrumental methods for analysis of soils and plant tissue. Soil Science Society of America.
- BROWN G.G. 1995. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity?. Plant and Soil 170:209-231.
- COVENTRY E., NOBLE R., MEAD A., WHIPPS J.M. 2005. Suppression of *Allium* white rot (*Sclerotium cepivorum*) in different soils using vegetable wastes. European Journal of Plant Pathology 111:101-112.
- DE BOER S.H., KELMAN A. 2001. Gram negative bacteria, pp. 56-72. In: N.W. Shaad, J.B. Jones, W. Chun (eds). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS.
- DOWNER A.J., CROHN D., FABER B., DAUGOVISH O., BECKER J.O., MENGE J.A., MOCHIZUKI M.J. 2008. Survival of plant pathogens in static piles of ground green waste. Phytopathology 98:547-554.
- EASTBURN D.M., GUBLER W.D. 1992. Effects of soil moisture and temperature on the survival of *Colletotrichum acutatum*. Plant Disease 76:841-842.
- EASTMAN B.R., KANE P.N., EDWARDS C.A. TRYTEK L., GUNADI B., STERMER A.L., MOBLEY J.R. 2001. The effectiveness of vermiculture in human pathogen reduction for USEPA biosolids stabilization. Compost Science and utilization 9:38-49.
- EDWARDS C.A., ARANCON N.Q. 2004. Interaction among organic matter, earthworms and microorganisms in promoting plant growth, pp. 327-376. In: F. Magdoff, R.R. Weil (eds). Soil organic matter in sustainable agriculture. CRC Boca Raton, Florida, USA.
- EDWARDS C.A., FLETCHER K.E. 1988. Interactions between earthworms and microorganisms in organic-matter breakdown. Agriculture, Ecosystem and Environment 24:235-247.
- FERRUZI C. 1994. Manual de lombricultura. Mundi-Prensa, Madrid 137 p.
- FRIBERG H, LAGERLOF J., RAMERT B. 2005. Influence of soil fauna on fungal plant pathogens in agricultural and horticultural systems. Biocontrol Science and Technology 15(7):641-658.
- FURLONG M.A., SINGLETON D.R., COLEMAN D.C., WHITMAN W.B. 2002. Molecular and culture-based analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and casts of the earthworm *Lumbricus rubellus*. Applied and Environmental Microbiology 68:1265-1279.
- INFOAGRO. 2008. La lombricultura. Infoagro Systems, S.L. Madrid, España. Consultada 27/9/2008 (<http://www.infoagro.com/abonos/lombricultura.htm>).
- KENNEL W. 1990. The role of the earthworm *Lumbricus terrestris* in integrated fruit production. Acta Horticulturae 285:149-156.

- LORCH H.J., BENCKIESER G., OTTOW J.C.G. 1995. Basic methods for counting microorganisms in soil and water, pp 146-191. In: K. Alef y P. Nannipieri (eds). Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic.
- NORMAN D.J., STRANDBERG J.O. 1997. Survival of *Colletotrichum acutatum* in soil and plant debris of leatherleaf fern. Plant Disease 81:1177-1180.
- PAUL E.A., CLARCK F.E. 1996. Soil microbial and biochemistry. 2° ed. Academic California, USA. 340 p.
- PRYSOR-WILLIAMS A., ROBERTS P., AVERY L.M., KILLHAM K., JONES D. L. 2006. Earthworms as vectors of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and vermicomposts. FEMS Microbiology Ecology 58:54-64.
- RODRÍGUEZ E., GAMBOA M.M., HERNÁNDEZ F., GARCÍA J.D. 2005. Bacteriología general. Editorial Universidad de Costa Rica, Costa Rica. 370 p.
- SCHILLER M., LÜBECK M., SUNDELIN T., CAMPOS-MELENDEZ L.F., DANIELSEN S., JENSEN D.F., MADRIZ-ORDEÑANA K. 2006. Two subpopulations of *Colletotrichum acutatum* are responsible for anthracnose in strawberry and leatherleaf fern in Costa Rica. European Journal of Plant Pathology 116:107-118.
- TIQUIA S.M., WAN J.H.C., TAM N.F.Y. 2002. Microbial population dynamics and enzyme activities during composting. Compost Science and Utilization 10(2):150-161.
- TOYOTA K., KIMURA M. 2000. Microbial community indigenous to the earthworm *Eisenia foetida*. Biology and Fertility of Soils 31:187-190.
- WALKLEY A., BLACK C.A. 1938. An examination of the Degtjareff's method for determination soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Sci. 37:29-38.
- WHARTON P., DIÉGUEZ J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. Revista Anales del Jardín Botánico de Madrid 61:3-22.
- WOLLUM A.G. 1982. Cultural methods for soil microorganisms, pp. 781-802. In: A.L. Page, R.H. Miller y K.R. Keeney (eds). Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. ASA y SSSA.