

# POBLACIONES MICROBIANAS, ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS Y SUBSTANCIAS HÚMICAS EN LA BIOTRANSFORMACIÓN DE RESIDUOS

## Microbial Populations, Enzyme Activity and Humic Substances in Biotransformation of Waste

Roberto Quintero Lizaola<sup>1‡</sup>

### RESUMEN

Se evaluaron poblaciones microbianas, actividades enzimáticas y sustancias húmicas (SH) durante el compostaje y vermicompostaje (*Eisenia andrei* Bouché) de paja de avena, subproducto de producción de cuerpos fructíferos del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*, con diferentes tamaños: molida (< 2mm) y picada (< 4mm). Se muestreó a los 23, 46, 69, 92, 115 y 148 días de la incorporación de lombrices (*Eisenia andrei*) y se comparó con tratamientos sin lombriz. En cada muestreo se midió la actividad enzimática respecto a: el ciclo del carbono (amilasa, celulasa, lipasa e invertasa), ciclo del nitrógeno (proteasa, amidasa, ureasa y nitrogenasa), ciclo del fósforo (fosfatasa ácida y alcalina) y ciclo del azufre (arilsulfatasa), y deshidrogenasa. Se evaluaron los ácidos húmicos (AH) liofilizados, analizando y determinando, por métodos físicos y químicos, color, carbono y grupos funcionales con espectroscopia infrarroja. Los resultados mostraron la influencia de la lombriz sobre la proporción de la población de bacterias en los tratamientos de paja picada (PP) y paja molida (PM) tanto en vermicomposta como composta. Los hongos y actinomicetos se presentaron en mayor cantidad en los tratamientos de paja molida con lombriz (PMCL) respecto al resto de los tratamientos. El tamaño de paja no tuvo influencia significativa en la proporción de las enzimas en las compostas, a diferencia de los tratamientos con lombriz que tuvieron resultados mayores en las enzimas muestreadas respecto a los tratamientos sin lombriz. Las mayores concentraciones de ácidos húmicos (AH) liofilizados se detectaron en el tratamiento de PMCL, así como las mayores concentraciones de enzimas.

**Palabras clave:** lombriz, paja de avena, composta.

<sup>1</sup> Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. 56230 Montecillo, Estado de México.

<sup>‡</sup> Autor responsable (quintero@colpos.mx)

### SUMMARY

Microbial populations, enzyme activity and humic substances (HS) were measured during composting and vermicomposting (*Eisenia andrei* Bouché) oat straw with a byproduct of production of fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. Different sizes were tested: ground (< 2 mm) and chopped (< 4mm). Sampling was done 23, 46, 69, 92, 115 and 148 days after incorporating earthworms (*Eisenia Andrei* Bouché). Results were compared with those of treatments without worms. In each sample enzyme activity was measured for carbon cycle (amylase, cellulase, lipase and invertase), nitrogen cycle (protease, amidase, urease and nitrogenase), the phosphorus cycle (acid and alkaline phosphatase) and sulfur cycle (arylsulfatase), and dehydrogenase. Humic acid (HA) lyophilizates were assessed by analyzing and identifying color, carbon and functional groups in infrared spectroscopy using physical and chemical methods. The results showed the influence of worms on the bacteria in the treatments of chopped straw (PP) and ground straw (PM) both vermicomposted and composted. Fungi and actinomycetes were found in the highest quantities in the ground straw earthworm (PMCL) treatments. Straw size had no significant influence on the proportion of the enzymes, contrasting with the earthworm treatments, which had higher values in the sampled enzymes than those without worms. The highest concentrations of lyophilized humic acids (HA), as well as the highest concentrations of enzymes, were detected in the PMCL treatments.

**Index words:** earthworms, oat straw, compost.

### INTRODUCCIÓN

La viabilidad de la utilización de las lombrices como una técnica de tratamiento de materiales orgánicos, originados de la actividad agroindustrial ha sido bien establecida con resultados positivos (Bailey y Lazarovits, 2003; Arancon *et al.*, 2003; Domínguez, 2004).

La utilización de las lombrices del suelo puede ser una respuesta ecológicamente racional, económicamente viable y socialmente aceptable (Sharma *et al.*, 2005). La lombriz compostera *Eisenia andrei* (Bouché) es un agente que se incluye entre las biotecnologías de la agricultura orgánica y agricultura en general, para incrementar el rendimiento de los cultivos (Suthar, 2012). La acción de la lombriz no es única; en la descomposición intervienen junto con los microorganismos degradadores aeróbicos (hongos, bacterias y actinomicetos), otros organismos: amilolíticos, lipolíticos, celulolíticos, ligninolíticos, amonificantes, fijadores de nitrógeno de vida libre, desnitrificantes y nitrificantes, que ayudan a digerir las sustancias que componen la materia orgánica (Domínguez *et al.*, 2010). Durante el proceso de vermicompostaje se generan compuestos bioactivos que son de importancia para los procesos bioquímicos y reguladores de los suelos, como las enzimas: amilasa, celulasa, lipasa, invertasa, proteasa, amidasa, ureasa, monoestereasa (fosfatasa ácida y alcalina), arilsulfatasa y deshidrogenasa (Askin y Kizilkaya, 2006; Karaca *et al.*, 2010; Turgay *et al.*, 2010). Además, se generan distintos tipos de antibióticos, vitaminas, hormonas y sustancias húmicas (ácidos húmicos, fúlvicos y huminas), de gran valor para la nutrición vegetal. Por la utilidad que representan, para el hombre y la naturaleza, deben reconocerse las cualidades de las lombrices y del vermicompostaje, en general, para tratar de devolver a la naturaleza los nutrientes y la fertilidad que durante años se han tomado del suelo. Su aplicación puede contribuir considerablemente al aprovechamiento y reciclaje productivo de estos desechos orgánicos y promover una utilización sostenible del suelo, en armonía con la naturaleza (Singh y Sharma, 2002). El objetivo de la presente investigación fue evaluar la influencia del tamaño de paja y la presencia de lombriz en las poblaciones microbianas, actividad enzimática y sustancias húmicas durante el proceso de compostaje y vermicompostaje de paja de avena, subproducto de la producción del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó, en el laboratorio de microbiología del Postgrado de Edafología, en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Las unidades experimentales fueron cajas

de plástico de 20 × 31 × 13 cm, donde se colocó paja de avena molida (< 2mm) y picada (< 4mm), en la que se había cultivado *Pleurotus ostreatus*, se humedeció al 80%. Al día siguiente, se colocaron 200 lombrices cliteladas (*Eisenia andrei* Bouché) por caja. Se consideraron cuatro tratamientos: 1) paja molida con lombriz, 2) paja molida sin lombriz, 3) paja picada con lombriz y 4) paja picada sin lombriz. Se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar considerando 5 repeticiones.

Se muestreo a los 23, 46, 69, 92, 115 y 148 días después de la inoculación con las lombrices. La humedad de las cajas se mantuvo entre el 75 y 85% de la capacidad de campo y la temperatura entre 25 y 30 °C. Se evaluó la dinámica de los grupos microbianos: bacterias, actinomicetos y hongos, mediante unidades formadoras de colonias (ufc) desarrolladas en los lapsos mencionados y las poblaciones de grupos microbianos específicos: celulolíticos, lipolíticos, ligninolíticos, proteolíticos, amonificantes, nitrificantes (nitrito oxidantes y amonio oxidantes), desnitrificantes y fijadores libres de nitrógeno (Cuadro 1).

Las muestras de vermicomposta y composta se colectaron bajo condiciones asépticas, con una espátula acanalada, se colectaron 10 submuestras al azar de cada caja preparándose una muestra compuesta. Se tomaron 10 g de cada muestra compuesta y se realizaron diluciones decimales seriadas con agua destilada estéril, con una alícuota de 0.1 mL de diluciones  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ , se inocularon placas Petri por quintuplicado con los medios de cultivo específicos para cada grupo microbiano (Cuadro 1). En el caso de los microorganismos amilolíticos, proteolíticos, amonificantes, nitrificantes (amonio oxidante y nitrito oxidante) y desnitrificantes, la evaluación se realizó mediante la técnica del número más probable (NMP). En esta técnica se inoculó 0.1 mL de diluciones seleccionadas de la muestra a analizar, en tubos, con medio de cultivo específico por quintuplicado y se incubaron de acuerdo con la mayor expresión de cada grupo microbiano a 28 °C. El NMP se obtuvo interpolando el número característico, obtenido a través de reacciones de identificación correspondientes de cada grupo microbiano, en la tabla de números más probables de Cochran (1950) y Alexander (1982), para cinco tubos por dilución.

Se evaluó la actividad de las enzimas que participan en el ciclo del carbono (amilasa, celulasa, lipasa, invertasa), nitrógeno (proteasa, amidasa, ureasa y

**Cuadro 1. Medios de cultivo, tiempo de incubación y formas de identificación empleados en la cuantificación de los grupos microbianos estudiados.**

Grupo microbiano	Medio de cultivo	Tiempo de incubación (días)	Método de identificación	Referencia
Grandes grupos microbianos				
Bacterias totales <sup>†</sup>	Agar nutritivo	3-5	Morfología típica	Wollum (1982)
Hongos totales <sup>†</sup>	Medio de Martín	5-7	Morfología típica	Wollum (1982)
Actinomicetos <sup>†</sup>	Agar- Czapeck	7-10	Morfología típica	Wollum (1982)
Grupos microbianos con actividad fisiológica específica				
Amilolíticos <sup>‡</sup>	Almidón	14	Lugol	Wollum (1982)
Amonificantes <sup>‡</sup>	Peptona gelatina	14	Nessler	Levine (1953)
Celulolíticos <sup>†</sup>	Carboximetil-celulosa	7-10	Rojo congo y NaCl	Suyama et al.(1993)
Desnitrificantes <sup>†</sup>	Caldo nutritivo+ KNO <sub>3</sub>	14	Producción de gas y difenilamina	Tiedje (1982)
Fijadores de N <sub>2</sub> de vida libre <sup>†</sup>	Carbono combinado	3-5	Morfología típica	Rennie (1981)
Ligninolíticos <sup>†</sup>	Ácido tánico	21	Morfología típica	Subba Rao (1993)
Lipolíticos <sup>†</sup>	Agar-Tween- 80	2-7	Morfología típica	Harrigan y Mac Cance (1996)
Proteolíticos <sup>‡</sup>	Agar-gelatina	14	Licuefacción	Levine (1953)
Nitrificantes				
Nitrato-oxidantes <sup>‡</sup>	NO <sub>2</sub> +sales minerales	21	Viraje de indicador	Schmidt y Belser (1982)
Amonio- oxidantes <sup>‡</sup>	NH <sub>4</sub> +sales minerales	21	Viraje de indicador	Schmidt y Belser (1982)

<sup>†</sup>ufc (unidades formadoras de colonias) cuantificadas en placas de agar. <sup>‡</sup>NMP = Grupos microbianos evaluados por el número más probable (NMP).

nitrogenasa), fósforo (fosfatasa ácida y alcalina, fosfomonoesterasas) y azufre (arilsulfatasa); y la deshidrogenasa (Cuadro 2).

La separación de las fracciones de ácidos húmicos (AH) a partir de las muestras de composta y vermicomposta, se hizo por medio del método de Kononova y Belchikova (1961). En este procedimiento se utilizan álcalis y ácidos diluidos como NaOH 0.1 M y Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1 M (pirofosfato de sodio). Se obtuvieron espectros de infrarrojo (IR) para identificar grupos funcionales, preparando en primer lugar pastillas de 1 g que contenían 99% de KBr y 1% de la muestra problema. El material se mezcló bien, moliéndolo en un mortero de ágata y compactándolo con una prensa que produce una presión de 10 Mg cm<sup>-2</sup>. La pastilla se colocó en un espectrofotómetro de IR Perkin Elmer modelo 683 y se adquirió el espectro entre 4600 y 400 cm<sup>-1</sup>. Posteriormente, se identificaron las principales bandas correspondientes a los distintos grupos funcionales (Stevenson, 1994).

Los datos obtenidos de la actividad microbiológica y enzimática fueron sometidos a un análisis de varianza y las medias de los tratamientos a una prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Se emplearon los procedimientos incluidos en el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1998).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al finalizar el experimento (148 días), el tamaño de paja de avena, subproducto del cultivo de *Pleurotus ostreatus*, no influyó de manera significativa en la cantidad de microorganismos totales: bacterias, actinomicetos y hongos. Sin embargo, la presencia de la lombriz (*Eisenia andrei* Bouché) incrementó el número de unidades formadoras de colonias de las bacterias en los tratamientos de paja molida (PM) y paja picada (PP) en comparación con los tratamientos sin lombriz. Para los actinomicetos y los hongos los tratamientos de paja molida con lombriz (PMCL) tuvieron diferencias significativas con los que solo tenían PM, y ocurrió lo contrario en los tratamientos con PP que tuvieron más unidades formadoras de colonias de actinomicetos y hongos que los tratamientos de paja picada con lombriz (PPCL).

Las poblaciones de bacterias, actinomicetos y hongos disminuyeron entre los 69 y 148 días en todos los tratamientos, debido al agotamiento de compuestos carbonados de fácil descomposición (Paul y Clark, 1989; Brock y Madigan, 1993). La presencia de lombrices redujo el número de actinomicetos significativamente

**Cuadro 2. Metodologías empleadas en la cinética de las enzimas participantes en el ciclo del carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y la deshidrogenasa.**

Enzima	Sustrato	Amortiguador	Temperatura °C	Tiempo Horas	Producto	Referencia
Amilasa (EC 3.2.1.)	Almidón	Fosfatos pH 5.5	37	24	Azúcares reducidos	Ross, 1966
Celulasa (EC 3.2.1.4.)	Carboximetil Celulosa	Acetato 2M pH 5.5	50	24	Azúcares reducidos	Schinner y von Mersi, 1990
Lipasa (EC 3.1.1.3)	4-metil umbeliferona (4-MU)	Tris 0.1 M pH 7.5	30	10 min	4 metil umbeliferona heptanoato (4-MUH)	Schinner <i>et al.</i> 1991
Invertasa (EC 3.2.1.26)	Sacarosa 20%	Acetato 2 M pH 5.5	37	24	Azúcares reducidos	Schinner y von Mersi, 1990
Proteasa (EC 3.4.23.2.)	Caseinato de sodio	Tris 50 mM pH 8.1	50	2	Tirosina	Ladd y Butler, 1972
Amidasa (EC 3.5.1.4)	Formamida Acetamida	Tris H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1M pH 8.5	37	2	N-NH <sub>4</sub>	Frankenberger y Tabatabai, 1980
Ureasa (EC 3.5.1.5)	Propionamida	Tris hidroximetil amino metano	37	2	N-NH <sub>4</sub>	Tabatabai, 1982
	Solución de urea 200 mM	50 mM pH 9.0				
Nitrogenasa (EC 1.7.99.2)	Acetileno		25 a 30	24	Etileno	Quintero, 1998
Fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2)	Difenilfosfato de sodio	Acetato pH 5	37	3	Fenol	Beck, 1984
Fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1)	Difenilfosfato de sodio	Borato pH 10	37	3	Fenol	Beck, 1984
Arilsulfatasa (EC 3.1.6.1)	p-nitrofenol	Acetato 0.5 M pH 5.8	37	1	p-nitrofenol	Tabatabai, 1994
Deshidrogenasa EC 1.2.1.12)	sulfato Cloruro 2,3,5- Trifeniltetrazolio (TTC)	Tris HCl 100 mM	30	24	Trifenil formazán	Thalman, 1968

TPF

( $\alpha = 0.05$ ) respecto a los tratamientos sin lombrices (Cuadro 3).

Se observaron menos bacterias en composta de estiércol combinada con lombrices que en la composta de estiércol (Allievi *et al.*, 1987), reportan la misma tendencia en vermicompostas preparadas con paja de avena, estiércol de bovino, desechos hortofrutícolas y mezclas de éstos. Los cambios inducidos por las lombrices; competencia por nutrientes, depredación entre las lombrices y los grandes grupos microbianos, pueden explicar dicho comportamiento (Trigo y Lavelle, 1993).

En la parte anterior del tracto digestivo de las lombrices, las poblaciones microbianas ingeridas con

el suelo, se reproducen rápidamente e incrementan su número, debido a la adición de agua, moco y CaCO<sub>3</sub> (este último eleva el pH), así como al mezclado intensivo; posteriormente, en las porciones media y posterior del tracto digestivo, las poblaciones microbianas presentes degradan los materiales orgánicos en condiciones microaerofílicas, liberando nutrientes tanto para los microorganismos como para la lombriz; una vez que se tienen los túriculos fuera de la lombriz, la actividad microbiana decrece por el cambio de las condiciones microaerofílicas o aerobias (Maboeta y Van Rensburg 2003; Suthar, 2012). Lo anterior se observó en *Allolobophora molleri* (Trigo y Lavelle, 1993), *Amyntas corticis* y *A. gracilis* (Barois, 1992). Brown

**Cuadro 3. Unidades formadoras de colonias (ufc) de bacterias, actinomicetos y hongos durante el proceso de producción de vermicomposta y composta preparadas con paja de avena subproducto de la producción comercial del hongo *Pleurotus ostreatus*.**

Días de muestreo	Bacterias		Actinomicetos		Hongos	
	Paja molida <sup>†</sup>	Paja picada <sup>‡</sup>	Paja molida	Paja picada	Paja molida	Paja picada
	- - - - - ufc × 10 <sup>6</sup> g <sup>-1</sup> materia seca - - - - -		- - - - -		- - ufc × 10 <sup>4</sup> g <sup>-1</sup> materia seca - -	
Con lombrices						
23	70.4	53.3	1.4	0.2	148.3	185.4
46	64.6	118.2	1.3	0.2	27.1	67.2
69	24.4	52.2	0.8	0.9	57.5	45.2
92	4.9	3.9	0.5	0.1	10.8	18.1
115	1.0	1.6	0.5	0.0	18.0	17.0
148	4.3	3.1	0.4	0.1	26.1	9.2
Sin lombrices						
23	19.6	47.4	0.2	1.5	42.8	309.8
46	45.8	57.9	0.3	0.1	50.1	16.0
69	19.3	23.4	0.2	0.1	26.1	19.0
92	3.0	10.7	0.2	0.2	14.4	32.1
115	1.8	1.4	0.4	0.4	10.2	11.2
148	3.3	1.8	0.2	0.04	20.6	13.6

<sup>†</sup> Paja molida < 2mm; <sup>‡</sup> Paja picada < 4mm. ufc: medio gelificado. DSH (0.05)<sub>Bacterias</sub> = 2.7209; DSH (0.05)<sub>Actinomicetos</sub> = 0.0306; DSH (0.05)<sub>Hongos</sub> = 2.2713.

(1995) indica que existe evidencia de que en el tracto digestivo de las lombrices hay sustancias microbicidas y microbiostáticas, producidas por lombrices o microorganismos, donde las poblaciones con mayor capacidad de resistencia y adaptación predominan sobre las de menor capacidad. También se ha discutido el número de hongos y bacterias que fue mayor en los turrículos que en el tracto digestivo de la lombriz, debido a que pueden sobrevivir al proceso digestivo-enzimático (Toyota y Kimura, 1994). Heijnen y Marinissen (1995) señalan que las lombrices consumen microorganismos en forma selectiva, prefiriendo poblaciones introducidas en lugar de las autóctonas. En el caso de la proliferación de hongos, tanto en turrículos como en túneles, éstos disminuyeron (Stephens *et al.*, 1993). En general, el número de hongos, bacterias y actinomicetos, decrece con respecto al tiempo ya que las lombrices reducen las poblaciones de estos grupos microbianos (Aira *et al.*, 2007b; Vivas *et al.*, 2009).

El tamaño de paja utilizado no provocó diferencias significativas entre tratamientos respecto a los microorganismos asociados al ciclo del carbono (Cuadro 4). Los microorganismos amilolíticos fueron significativamente diferentes en el tratamiento de paja molida con lombriz (PMCL) con respecto al que solo tenía paja molida (PM). En el tratamiento de paja

picada con lombriz (PPCL) dichos microorganismos fueron menores que en el tratamiento con paja picada sin lombriz (PPSL). Esta tendencia cambio para los microorganismos celulolíticos, lipolíticos y ligninolíticos los tratamientos con lombriz (CL), tanto con PP y PM, se presentaron en mayor proporción que en los tratamientos sin lombriz (SL).

Los microorganismos amilolíticos presentaron un crecimiento mayor a los 69 días en los tratamientos con paja molida y picada con lombriz, mientras que en la paja picada sin lombriz su óptimo crecimiento fue a los 115 días, y en la paja molida sin lombriz a los 92 días (Cuadro 4). Las poblaciones de los cuatro tratamientos evaluados decrecieron a los 148 días. En el grupo microbiano celulolítico se observó una actividad máxima a los 46 días en todos los tratamientos y una disminución a los 69 días. Se observó un repunte de los organismos celulolíticos en los tratamientos con paja picada sin lombriz a los 115 días. Los microorganismos lipolíticos iniciaron con una población alta a los 23 días en los tratamientos PPCL: 155.1, PMCL: 70.4 y PPSL: 98.4, y sufrieron una caída considerable a los 46 días; PPCL: 87.8, PMCL: 25 y PPSL: 43.9, la tendencia se mantuvo hasta los 148 días de establecido el experimento con un máximo de ufc de los organismos lipolíticos a los 23 días, es probable que este comportamiento se deba a la mayor

**Cuadro 4. Número más probable (NMP) y de unidades formadoras de colonias (ufc) de microorganismos participantes en el ciclo del carbono 23, 46, 69, 92, 115 y 148 días después de iniciado el proceso de compostaje con y sin lombrices y dos tamaños de paja de avena (paja molida y paja picada), subproducto de la producción comercial del hongo *Pleurotus ostreatus*.**

Tamaño de paja	Con lombrices					Sin lombrices						
	23	46	69	92	115	Días de muestreo		46	69	92	115	148
	Amilolíticos (NMP $\times 10^5$ g <sup>-1</sup> materia seca)											
Paja molida <sup>†</sup>	1.6	13.8	204.7	2.2	72.1	3.8	0.3	9.2	6.4	31.1	5.6	4.9
Paja picada <sup>‡</sup>	0.4	3.2	144.6	11.3	46.1	8.9	0.3	10.2	2.6	117.6	125.6	3.3
	Celulolíticos (ufc $\times 10^5$ g <sup>-1</sup> materia seca)											
Paja molida	38.9	90.6	9.4	7.8	16	11.9	16.1	71.9	6.9	6.3	13.2	12
Paja picada	17.4	129.2	78.3	5.2	43.7	40.1	16.4	88.8	10	11.2	60.5	54.1
	Lipolíticos (ufc $\times 10^6$ g <sup>-1</sup> materia seca)											
Paja molida	70.4	25	6.4	4.6	1.8	17.7	16.1	37.1	9.8	7.8	2.3	16.9
Paja picada	155.1	87.8	22.0	11.3	1.2	14.7	98.4	43.9	25.1	14.2	1.4	17.4
	Ligninolíticos (ufc $\times 10^5$ g <sup>-1</sup> materia seca)											
Paja molida	1.1	1.6	11.7	1.9	0.5	0.5	1.6	1.6	6.4	2.9	1.1	0.4
Paja picada	6.7	5.1	72.3	2.3	2.2	0.5	15.5	2.7	54.1	1.3	1.6	0.4

<sup>†</sup> Paja molida < 2mm; <sup>‡</sup> Paja picada < 4mm. ufc: medio gelificado. DSH (0.05)<sub>Amilolíticos</sub> = 0.9452; DSH (0.05)<sub>Celulolíticos</sub> = 1.0602; DSH (0.05)<sub>Lipolíticos</sub> = 1.1205; DSH (0.05)<sub>Ligninolíticos</sub> = 0.4559

disponibilidad de compuestos lipídicos que son rápidamente aprovechados por los microorganismos. Barois *et al.* (1987) señalan que en el tracto digestivo de las lombrices predominan condiciones de microaerofílicas hasta anaerobias, las cuales pueden modificar el crecimiento de los microorganismos amilolíticos y celulolíticos, los cuales afectan la biotransformación del sustrato.

Las ufc de los organismos ligninolíticos (Cuadro 4) tuvieron su mayor actividad a los 69 días en los cuatro tratamientos. Los tratamientos con lombriz presentaron las mayores actividades para los microorganismos amilolíticos, celulolíticos, lipolíticos y ligninolíticos (Cuadro 4), lo que genera que haya una mayor disponibilidad de nutrientes en la vermicomposta que en la composta, debido al efecto degradador de las lombrices.

La cantidad de microorganismos relacionados con el ciclo del nitrógeno (Cuadro 5): proteolíticos, amonificantes, nitrificantes NO<sub>2</sub> oxidantes y fijadores libres de nitrógeno, fue afectada por el tamaño de paja, PM tuvo diferencias con respecto a los tratamientos de PP. Los nitrificantes NH<sub>4</sub> oxidantes, desnitrificantes y los tratamientos de PP tuvieron diferencias con los tratamientos de PM. En los tratamientos CL hubo más microorganismos proteolíticos, amonificantes, nitrificantes NH<sub>4</sub> oxidantes en los dos tamaños de paja

que en los tratamientos sin lombrices. En los tratamientos SL hubo mayor proporción de microorganismos nitrificantes NO<sub>2</sub> oxidantes, desnitrificantes y para el tratamiento de PP en fijadores libres de nitrógeno.

Los microorganismos proteolíticos presentaron un máximo desarrollo a los 23 días de iniciado el experimento en los cuatro tratamientos evaluados (Cuadro 5). Al existir sustrato disponible para los microorganismos amonificantes, y de acuerdo con la secuencia de los procesos del ciclo del nitrógeno, se observó un incremento máximo de los desnitrificantes, lo cual desfavoreció la calidad del producto final obtenido. Se observó un aumento de los microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre a los 46 días en el tratamiento PMCL y PMSL, a los 23 días en el tratamiento PPCL y PPSL. El tratamiento de PMCL tuvo la mayor cantidad de ufc de microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre, el cual probablemente aportó más sustrato para los grupos de microorganismos que se presentaron en las siguientes fases en el proceso de biotransformación, como los amonificantes y los nitrificantes -NH<sub>4</sub> oxidantes, con un óptimo en la dinámica poblacional a los 69 días en los cuatro tratamientos evaluados (Cuadro 5). Los nitrificantes -NO<sub>2</sub> oxidantes presentaron una población máxima a los 92 días en el tratamiento de la paja molida sin lombrices y con lombrices a los 115 días, obteniendo mayor cantidad de

**Cuadro 5. Número más probable (NMP) y de unidades formadoras de colonias (ufc) de microorganismos participantes en el ciclo del nitrógeno a los 23, 46, 69, 92, 115 y 148 días después de iniciado el proceso de compostaje con y sin lombrices y dos tamaños de paja de avena (paja molida y paja picada), subproducto de la producción comercial del hongo *Pleurotus ostreatus*.**

Tamaño de paja	Con lombrices						Sin lombrices					
	23		46		69		92		115		148	
	Días de muestreo											
	23	46	69	92	115	148	23	46	69	92	115	148
	Proteolíticos (NMP × 10 <sup>6</sup> g <sup>-1</sup> materia seca)											
Paja molida <sup>†</sup>	331.8	5.8	1.3	5	2.4	8.7	276.5	10.5	0.2	9.2	8.1	10
Paja picada <sup>‡</sup>	241.1	7.1	0.4	1.8	2.6	8.4	59.7	3.2	1.9	8.7	7.2	7.6
	Amonificantes (NMP×10 <sup>6</sup> g <sup>-1</sup> materia seca)											
Paja molida	1.2	57.5	128.7	6	2.4	1.0	1.5	22.9	8.1	2	1.8	1.3
Paja picada	1.2	124	2.0	2.4	4.5	0.6	0.3	55.1	18.9	1.12	6.3	0.9
	Nitrificantes-NH <sub>4</sub> oxidante (NMP×10 <sup>4</sup> g <sup>-1</sup> materia seca)											
Paja molida	1.4	3.8	17.0	11.9	0.6	0.1	0.2	1.2	13.9	6.9	0.4	0.6
Paja picada	0.1	1.4	16.9	10.8	0.5	1.2	0.9	1.1	20	11.2	0.4	0.2
	Nitrificantes-NO <sub>2</sub> oxidante (NMP×10 <sup>5</sup> g <sup>-1</sup> materia seca)											
Paja molida	0.1	1.8	1.2	1.2	24.3	0.1	0.2	1.9	1.3	92	46.7	0.1
Paja picada	0.1	1.8	1.8	2.9	0.8	0.8	0.6	1.6	1.6	1.6	1.2	0.1
	Desnitrificantes (NMP×10 <sup>5</sup> g <sup>-1</sup> materia seca)											
Paja molida	0.2	575	5.4	1.3	0.1	0.9	0.3	228.8	2.02	12.6	0.1	0.1
Paja picada	38	418.6	2.1	1.2	0.4	0.1	0.3	958.1	2.5	1.1	0.02	0.1
	Fijadores libres de nitrógeno (ufc×10 <sup>6</sup> g <sup>-1</sup> materia seca)											
Paja molida	7.1	221.9	41.8	5.4	1.1	9.8	5.2	5.2	28.3	5.5	2.3	8.1
Paja picada	64.8	4.7	37.1	7.5	1.7	7.9	7.9	98.4	20.3	19	5.2	10.2

<sup>†</sup> paja molida < 2mm; <sup>‡</sup> paja picada < 4mm. ufc: medio gelificado. DSH (0.05)<sub>Proteolíticos</sub> = 2.9241; DSH (0.05)<sub>Amonificantes</sub> = 1.8687; DSH (0.05)<sub>Nitrificantes</sub> = 0.3981; DSH (0.05)<sub>Microorganismos nitrificantes NO2 oxidantes</sub> = 0.1205; DSH (0.05)<sub>Desnitrificantes</sub> = 3.2575; DSH (0.05)<sub>Fijadores libres de nitrógeno</sub> = 0.9064.

nitritos, los cuales se biotransforman a nitratos por las bacterias nitrificadoras, siendo esto favorable a los cultivos.

Barois *et al.* (1987) encontraron 2.7 veces más NH<sub>4</sub> en turrículos de *Pontoscolex corethrurus* que en el suelo control, atribuyeron la alta excreción de nitrógeno por las lombrices a su eficiencia en la asimilación de carbono y a la estimulación de microorganismos amonificantes. Este amonio producido pudo favorecer la proliferación de nitrificantes, puesto que el amonio es usado como sustrato por estos microorganismos (Bohlen y Edwards, 1995), lo que concuerda con los resultados de los tratamientos con lombriz que obtuvieron los mayores resultados comparados con los tratamientos sin lombriz.

### Actividad Enzimática del Ciclo del Carbono

La actividad de las enzimas amilasa, celulasa, lipasa e invertasa, tuvieron una caída en los últimos dos muestreos en los tratamientos con lombriz (Cuadro 6). La actividad de la amilasa se incrementó casi al triple a

los 69 días en los tratamientos en que se adicionó lombriz (Tejada y González, 2009; Tejada y Benitez, 2011; Pramanilk *et al.*, 2010; Kizilkaya y Hepsen, 2004; Kizilkaya, 2008). Los tratamientos sin lombriz presentaron un pequeño incremento en ese mismo lapso, sin embargo, continuó con una tasa similar hasta el día 148. La elevada actividad de los tratamientos con lombriz decreció rápidamente en el periodo de 69 a 92 días de incubación, para situarse en un nivel inferior durante el resto de los muestreos en comparación a los tratamientos sin lombriz. En los tratamientos con lombriz, la actividad media de la amilasa en los seis muestreos en la PM fue de 46.2 y en la PP fue de 47.7 mg de az. red. 10 g<sup>-1</sup> de materia seca 24 h<sup>-1</sup>, más elevada que los tratamientos que no tuvieron lombriz, la PM de 39 y la PP de 41 mg de azúcares reductores 10 g<sup>-1</sup> materia seca 24 h<sup>-1</sup>. Estos resultados implican un producto final de mejor calidad de las vermicompostas respecto a las compostas.

La actividad de la celulasa presenta un máximo a los 46 días de haberse incorporado la lombriz en la PP y PM, en los tratamientos que no presentaron lombriz,

**Cuadro 6. Actividad enzimática de las enzimas relacionados con el ciclo del carbono: amilasa, celulasa, lipasa e invertasa a 23, 46, 69, 92, 115 y 148 días de la incorporación de lombrices en vermicompost preparadas con dos tamaños de paja de avena, subproducto de la producción comercial del hongo *Pleurotus ostreatus*, comparadas con sus compostas correspondientes sin lombrices.**

Tamaño de paja	Con lombrices						Sin lombrices					
	23		46		Días de muestreo		23		46		Días de muestreo	
	23	46	69	92	115	148	23	46	69	92	115	148
	Amilasa (mg de azúcares reductores 10 <sup>-1</sup> materia seca 24 h <sup>-1</sup> )											
Paja molida <sup>†</sup>	25	40	170	10	15	17	18	35	39	44	46	52
Paja picada <sup>‡</sup>	32	38	164	14	17	21	19	39	42	48	43	55
	Celulasa (mg de glucosa g <sup>-1</sup> de materia seca 24 h <sup>-1</sup> )											
Paja molida	13	68	43	20	34	38	17	25	17	18	16	19
Paja picada	29	83	42	11	22	25	14	59	42	18	32	37
	Lipasa (nM 4-metil umbeliferona g <sup>-1</sup> de materia seca h <sup>-1</sup> )											
Paja molida	140	125	112	94	86	70	86	94	79	65	56	40
Paja picada	170	165	158	143	125	98	93	74	62	59	51	48
	Invertasa (mg de glucosa g <sup>-1</sup> materia seca 24 h <sup>-1</sup> )											
Paja molida	6.5	6.2	5.9	5.8	4.5	4.2	3.9	3.6	2.8	2.4	2.3	2.0
Paja picada	4.0	3.6	3.2	2.8	2.3	2.2	3.8	3.5	3.2	2.9	2.5	2.1

<sup>†</sup> Paja molida < 2mm; <sup>‡</sup> Paja picada < 4mm. ufc: medio gelificado. DSH (0.05)<sub>Amilasa</sub> = 1.4614; DSH (0.05)<sub>Celulasa</sub> = 2.1364; DSH (0.05)<sub>Lipasa</sub> = 4.2054; DSH (0.05)<sub>Invertasa</sub> = 0.2327

la actividad de la celulasa fue menor (Cuadro 6). Aira *et al.* (2007a,b), encontraron un incremento en la actividad de la celulasa en un periodo corto y después un decaimiento en vermicomposta, lo cual influye en la disminución en general de las sustancias húmicas. La media de la actividad celulasa en los tratamientos correspondientes a PM y PP entre los seis muestreos fue de 36 y 35.3 mg de glucosa g<sup>-1</sup> de materia seca 24 h<sup>-1</sup> respectivamente cuando se agregó lombriz, mientras que en los que no se agregó estas medias fueron de 18.7 y 33.7 mg de glucosa g<sup>-1</sup> de materia seca 24 h<sup>-1</sup> respectivamente (Cuadro 6), lo que representa una mayor degradación de celulosa. Kshattriya *et al.* (1992) observaron que el tamaño de paja influyó significativamente en la degradación de la celulosa, los tratamientos con paja picada tuvieron mayor actividad de la celulasa en comparación con los tratamientos con paja molida (Cuadro 6).

### Actividad Enzimática del Ciclo del Nitrógeno

La proteasa presenta una actividad máxima a los 23 días y disminuye paulatinamente en el tiempo. Los tratamientos que mayor actividad de proteasa presentaron fueron los que tenían lombriz, el valor medio de todo el ciclo en la PM fue de 126.17 y en la PP de 102.5 en comparación con los tratamientos con

los mismos tamaños de paja sin lombriz, 87.17 y 79.17 mg eq respectivamente. El tratamiento sin lombrices presentó menor Tirosina g<sup>-1</sup> M. S. 24 h, 31 y 23% respectivamente, en comparación con el tratamiento con lombrices (Cuadro 7). Se observó que conforme aumentó el periodo de la composta y vermicomposta, disminuyó la proteasa, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Perucci (1990 y 1992) y Nannipieri *et al.*, (1990), obteniéndose un producto final (vermicomposta) con mayor contenido de nitrógeno.

La amidasa presentó una disminución de actividad a partir de los 46 días, siendo más alta en los tratamientos con lombrices que en aquéllos sin lombrices, presentó mayor actividad a los 23 días en los cuatro tratamientos (Cuadro 7), concordando con los resultados de Frankenberger y Tabatabai (1981) en cuanto al comportamiento de actividad enzimática. La ureasa presentó una disminución gradual a partir de los 23 días, que fue el de máxima actividad para los cuatro tratamientos (Cuadro 7). La ureasa es muy estable en la vermicomposta (Fenn *et al.*, 1992; Kizilkaya y Hepsen, 2004, 2007; Kizilkaya, 2008; Tejada y González, 2009; Tejada y Benitez, 2011), el comportamiento que tuvo donde se agregó lombriz se obtuvieron valores más altos, que en los tratamientos sin lombriz. La asociación entre lombrices y microorganismos favorece la descomposición de materia orgánica sobre



**Cuadro 7. Actividad enzimática de proteasa, amidasa, ureasa y nitrogenasa a 23, 46, 69, 92, 115 y 148 días de la incorporación de lombrices en vermicomposta preparada con dos tamaños de paja de avena, subproducto de la producción comercial del hongo *Pleurotus ostreatus*, comparada con composta sin lombrices.**

Tamaño de paja	Con lombrices						Sin lombrices					
	23		46		69		92		115		148	
	Días de muestreo											
	23	46	69	92	115	148	23	46	69	92	115	148
	Proteasa (mg equivalente de tirosina g <sup>-1</sup> materia seca 2 h <sup>-1</sup> )											
Paja molida <sup>†</sup>	373	165	80	55	43	41	214	124	60	53	41	31
Paja picada <sup>‡</sup>	265	154	70	51	39	36	204	112	54	44	32	29
	Amidasa (mg N-NH <sub>4</sub> g <sup>-1</sup> materia seca 2 h <sup>-1</sup> )											
Paja molida	2.06	2.01	1.98	1.77	1.65	1.56	1.64	1.62	1.58	1.53	1.40	1.20
Paja picada	1.96	1.84	1.82	1.60	1.54	1.48	1.34	1.28	1.17	1.10	1.08	1.02
	Ureasa (mg N-NH <sub>4</sub> g <sup>-1</sup> materia seca 2 h <sup>-1</sup> )											
Paja molida	0.52	0.50	0.49	0.44	0.41	0.39	0.41	0.40	0.39	0.38	0.35	0.30
Paja picada	0.49	0.46	0.45	0.40	0.38	0.37	0.33	0.32	0.29	0.27	0.27	0.25
	Nitrogenasa (pMol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> g <sup>-1</sup> materia seca 24 h <sup>-1</sup> )											
Paja molida	107.23	263.45	176.79	17.28	10.53	6.85	84.19	143.12	167.73	8.40	21.80	13.36
Paja picada	36.78	106.94	239.35	9.59	34.96	14.21	24.25	114.54	100.51	63.20	53.07	1.32

<sup>†</sup> Paja molida < 2mm; <sup>‡</sup> Paja picada < 4mm. ufc: medio gelificado. DSH (0.05)<sub>Proteasa</sub> = 3.9136; DSH (0.05)<sub>Amidasa</sub> = 0.0319; DSH (0.05)<sub>Ureasa</sub> = 0.0205; DSH (0.05)<sub>Nitrogenasa</sub> = 2.2727.

la mineralización. La actividad enzimática de la nitrogenasa se observó en un óptimo a los 46 y 69 días después de inoculadas las lombrices en los tratamientos que así se plantearon, y una actividad mínima a los 92 días. Por lo tanto, para conservar una actividad óptima con respecto a los microorganismos fijadores de nitrógeno es conveniente la cosecha del vermicomposta a los 75 días después de su inoculación. La actividad de la proteasa disminuye fuertemente conforme las composta y vermicomposta tienen mayor tiempo de incubación (Cuadro 7) (Simek y Pizl, 1989; Domínguez y Edwards, 2004; Nagavallema *et al.*, 2004; Macci *et al.*, 2010).

#### Actividad Enzimática de la Deshidrogenasa

Esta enzima se ha utilizado para calcular la actividad microbiana total en los procesos de mineralización (Frankenberger y Dick, 1983). La actividad de la deshidrogenasa en los procesos de vermicompostaje y compostaje evaluados, fue mayor en los tratamientos con lombriz, la paja molida de 1.48 y la paja picada de 1.50 que los tratamientos sin lombriz; paja molida de 1.24 y paja picada de 1.16 mg TPF g<sup>-1</sup> materia seca 24 h<sup>-1</sup>, 16% menor en la paja molida y 22% menor en la paja picada (Cuadro 8). Lo anterior nos muestra la alta actividad de la deshidrogenasa en la vermicomposta

debido a la actividad de la lombriz (Dick, 1997; Kizilkaya y Hepsten, 2004; Kizilkaya, 2008).

#### Actividad Enzimática del Ciclo del Fósforo

Se observó que en los tratamientos con lombriz la actividad enzimática de la fosfatasa ácida se incrementó en 53% en la PM y en 22% en la PP con respecto a los tratamientos sin lombriz (Cuadro 8). En trabajos realizados por Satchell y Martin (1984) en los que se midió la actividad de la fosfatasa (ácida y alcalina) en vermicomposta con residuo de papel y cuatro especies de lombrices incluyendo *Eisenia andrei*, atribuyendo el incremento de la fosfatasa ácida y alcalina, a la actividad microbiana del tracto digestivo de la lombriz. En el caso de la fosfatasa alcalina, los valores medios de todo el ciclo en los tratamientos con lombriz fueron en PM de 2.00 y en PP de 1.79 y en los que no se agregó lombriz de 1.61 y 1.47 mg de p-nitrofenol g<sup>-1</sup> materia seca h<sup>-1</sup>. En el caso de la fosfatasa alcalina se observó una mayor actividad en las vermicompostas que en las compostas, 20% mejor en los primeros con PM y 18% en la PP (Cuadro 8). La actividad de la fosfatasa alcalina fue mayor, comparada con la ácida en todos los tratamientos, y se atribuye a que las especies composteras como *Eisenia andrei* presentan glándulas calcíferas de Morren que excretan calcio (Edwards y Fletcher, 1988).

**Cuadro 8. Actividad enzimática de deshidrogenasa, fofatasa ácida, fofatasa alcalina y arilsulfatasa a los 23, 46, 69, 92, 115 y 148 días de la incorporación de lombrices en vermicomposta preparada con dos tamaños de paja de avena subproducto de la producción comercial del hongo *Pleurotus ostreatus*, comparada con su composta correspondiente sin lombrices.**

Tamaño de paja	Con lombrices						Sin lombrices					
	Días de muestreo											
	23	46	69	92	115	148	23	46	69	92	115	148
Deshidrogenasa (mg TFF g <sup>-1</sup> materia seca 24 h <sup>-1</sup> )												
Paja molida <sup>†</sup>	1.76	1.72	1.68	1.43	1.25	1.03	1.44	1.32	1.49	1.12	1.03	1.01
Paja picada <sup>‡</sup>	1.65	1.79	1.68	1.45	1.32	1.08	1.33	1.24	1.18	1.13	1.04	1.02
Fofatasa ácida (mg p-nitrofenol g <sup>-1</sup> materia seca h <sup>-1</sup> )												
Paja molida	0.23	0.25	0.34	0.41	0.44	0.48	0.13	0.14	0.16	0.18	0.20	0.22
Paja picada	0.18	0.20	0.22	0.24	0.25	0.28	0.12	0.13	0.19	0.20	0.21	0.21
Fofatasa alcalina (mg p-nitrofenol g <sup>-1</sup> materia seca h <sup>-1</sup> )												
Paja molida	1.82	1.92	1.96	2.10	2.08	2.10	1.45	1.48	1.62	1.67	1.75	1.69
Paja picada	1.64	1.72	1.76	1.79	1.84	1.97	1.32	1.35	1.44	1.54	1.58	1.61
Arilsulfatasa (mg p-nitrofenol g <sup>-1</sup> materia seca h <sup>-1</sup> )												
Paja molida	0.11	0.13	0.15	0.18	0.21	0.22	0.04	0.06	0.07	0.09	0.11	0.13
Paja picada	0.08	0.09	0.11	0.14	0.18	0.21	0.03	0.05	0.06	0.07	0.08	0.10

<sup>†</sup> Paja molida < 2mm; <sup>‡</sup> Paja picada < 4mm. ufc: medio gelificado. DSH (0.05)<sub>Deshidrogenasa</sub> = 0.0278; DSH (0.05)<sub>Fofatasa ácida</sub> = 0.0194; DSH (0.05)<sub>Fofatasa alcalina</sub> = 0.0283; DSH (0.05)<sub>Arilsulfatasa</sub> = 0.0167.

Esto posiblemente sea el mecanismo por el cual se incrementa el pH de los sustratos después de pasar por el tracto digestivo de la lombriz (Edwards y Fletcher, 1988).

### Actividad Enzimática del Ciclo del Azufre

La actividad de la arilsulfatasa, medida en las vermicompostas y compostas (Cuadro 8), mostró una tendencia a incrementarse en el último muestreo realizado a los 148 días, en los cuatro tratamientos evaluados. En los que se utilizó la PM con lombriz, la actividad media fue de 0.17 y sin lombriz 0.08, en la PP con lombriz de 0.14 y en la composta de 0.07. En el caso de la PM, la lombriz incrementó 53% y en la PP 50%, influyendo, además, el tamaño de la paja en dicha actividad. Según trabajos de Klose y Tabatabai (1999), esta enzima se ve influida por la biomasa microbiana y la lombriz empleada (*Eisenia andrei*), lo que concuerda con los resultados obtenidos.

### Ácidos Húmicos

La producción de ácidos húmicos fue más alta en los tratamientos con paja molida (PM) con respecto a los de la paja picada (PP), tratamientos con lombrices (Cuadro 9). A los 148 días los tratamientos con mayor

cantidad de mg de ácidos húmicos (AH) 10 g<sup>-1</sup> de materia seca fueron los que contenían lombriz, y el mayor fue el de paja molida con lombrices (PMCL) con 12.3 mg de AH 10 g<sup>-1</sup> de materia seca. Esto indica que los materiales molidos en las condiciones experimentales estudiadas tuvieron una mejor respuesta en la producción de AH liofilizados, debido a una más fácil degradación en comparación con la paja picada. En el caso de los tratamientos de PM y PP sin lombrices, la producción

**Cuadro 9. Concentraciones de ácidos húmicos (AH) liofilizados a 23, 46, 69, 92, 115, y 148 días después de la incorporación de lombrices (*Eisenia andrei*) en vermicomposta preparada con paja molida (PM) y picada (PP) de avena, subproducto de la producción comercial de hongo *Pleurotus ostreatus*, comparado con su composta correspondiente sin lombrices.**

Días de muestreo	Producción de ácidos húmicos liofilizados			
	Con lombrices		Sin lombrices	
	Paja molida	Paja picada	Paja molida	Paja picada
	- - - - mg de AH • 10 g <sup>-1</sup> de materia seca - - - -			
23	2.1	1.1	0.4	0.2
46	3.6	1.6	0.8	0.6
69	4.5	1.9	1.1	0.7
92	6.8	3.4	2.0	1.2
115	9.3	6.2	2.8	1.4
148	12.3	8.4	3.2	2.2

de los AH liofilizados fue más alta en el tratamiento con paja molida comparada con la paja picada en los diferentes periodos de muestreo durante el experimento, lo que beneficia la capacidad de intercambio catiónico en el suelo y mejora la actividad microbiológica del mismo.

## CONCLUSIONES

El tamaño de paja no influyó en las poblaciones microbianas, actividad enzimática y producción de ácidos húmicos liofilizados. Sin embargo, la incorporación de la lombriz *Eisenia andrei* (Bouché) tuvo influencia en las variables medidas que fueron: amilasa, celulasa, lipasa, invertasa, proteasa, amidasa, ureasa, nitrogenasa, fosfatasa ácida y alcalina, arilsulfatasa y deshidrogenasa, así como los microorganismos proteolíticos, amonificantes, nitrificantes, celulolíticos, amilolíticos, lipolíticos. Lo que muestra que la mineralización en el proceso de vermicompostaje se acelera respecto a una composta, lo que podría reflejarse en una mayor disponibilidad de nutrientes para los cultivos biofertilizados con vermicomposta.

## LITERATURA CITADA

- Aira, M., F. Monroy, and J. Domínguez. 2007a. Microbial biomass governs enzyme activity decay during aging of worm-worked substrates through vermicomposting. *J. Environ. Qual.* 36: 448-452.
- Aira, M., F. Monroy, and J. Domínguez. 2007b. Earthworms strongly modify microbial biomass and activity triggering enzymatic activities during vermicomposting independently of the application rates of pig slurry. *Sci. Total Environ.* 385: 252-261.
- Alexander, M. 1982. Most probable number method for microbial populations. pp. 815-820. *In: A. L. Page (ed.). Methods of soil analysis. Part 2, Agronomy Monograph. 9. ASA and SSSA. Madison, WI, USA.*
- Allievi, L., B. Citterio, and A. Ferrari. 1987. Vermicomposting of rabbit manure: Modifications of microflora. pp. 115-126. *In: M. De Bertoldi, M. P. Ferranti, P. L. Hermite, and F. Zuccroni (eds.). Compost: Production, quality and use. Elsevier Applied Science. London, UK*
- Arancon, N. Q., C. A. Edwards, P. Bierman, J. D. Metzger, S. Lee, and C. Welch. 2003. Effects of vermicomposts on growth and marketable fruits of field-grown tomatoes, peppers and strawberries. *Pedobiologia* 47: 731-735.
- Askin, T. and R. Kizilkaya. 2006. Assessing spatial variability of soil enzyme activities in pasture topsoils using geostatistics. *Eur. J. Soil Biol.* 42: 230-237.
- Bailey, K. L. and G. Lazarovits. 2003. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. *Soil Tillage Res.* 72: 169-180.
- Barois, I. 1992. Mucus production and microbial activity in the gut of two species of *Amyntas* (Megascolecidae) from cold and warm tropical climates. *Soil Biol. Biochem.* 24: 1507-1510.
- Barois, I., B. Verdier, P. Kaiser, A. Mariotti, P. Rangel, and P. Lavelle. 1987. Influence of the tropical earthworm *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae) on the fixation and mineralization of nitrogen. pp. 151-158. *In: A. M. Bonvicini-Pagliai and P. Omodeo (eds.). On earthworms. Mucchi Modena Editore. Bologna, Italia.*
- Bohlen, P. J. and C. A. Edwards. 1995. Earthworm effects on N dynamics and soil respiration in microcosms receiving organic and inorganic nutrients. *Soil Biol. Biochem.* 27: 341-348.
- Brock, T. D. y M. T. Madigan. 1993. *Microbiología.* Prentice Hall Hispanoamericana. México, D. F.
- Brown, G. G. 1995. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? *Plant Soil* 170: 209-231.
- Cochran, W. G. 1950. Estimation of bacterial densities by means of the "most probable number". *Biometrics* 6: 105-1116.
- Dick, R. P. 1997. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. pp. 121-156. *In: C. Pankhurst, B. M. Doube, and V. V. S. R. Gupta (eds.). Biological indicators of soil health. CAB International. London, UK.*
- Domínguez, J. and C. A. Edwards. 2004. Vermicomposting organic wastes: A review. pp. 369-395. *In: S. H. Shakir Hanna and W. Z. A. Mikhail (eds.). Soil zoology for sustainable development in the 21st century. Cairo.*
- Domínguez, J., M. Aira, and M. Gómez-Brandón. 2010. Vermicomposting: Earthworms enhance the work of microbes. pp. 93-114. *In: H. Insam, I. Franke-Whittle, and M. Goberna (eds.). Microbes at work: From wastes to resources. Springer-Verlag. Berlin.*
- Edwards, C. A. and K. E. Fletcher. 1988. Interactions between earthworms and microorganisms in organic-matter breakdown. *Agric. Ecosys. Environ.* 24: 235-247.
- Fenn, L. B., J. L. Tipton, and G. Tatum. 1992. Urease activity in two cultivated and non-cultivated arid soils. *Biol. Fertil. Soils* 13: 152-154.
- Frankenberger, W. T. Jr. and W. Dick. 1983. Relationships between enzyme activities and microbial growth and activity indices in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47: 945-951.
- Frankenberger, W. T. Jr. and M. A. Tabatabai. 1981. Fate of amide nitrogen added to soils. *Agricul. Food Chem.* 29: 152-155.
- Heijnen, C. E. and J. C. Y. Marinissen. 1995. Survival of bacteria introduced into soil by means of transport by *Lumbricus rubellus*. *Biol. Fertil. Soils* 20: 63-69.
- Karaca, A., S. C. Cetin, O. C. Turgay, and R. Kizilkaya. 2010. Effects of heavy metals on soil enzyme activities. pp. 237-262. *In: I. Sherameti and A. Varma (eds.). Soil heavy metals (Soil biology). Springer. Berlin.*
- Kizilkaya, R. 2008. Dehydrogenase activity in *Lumbricus terrestris* casts and surrounding soil affected by addition of different organic wastes and Zn. *Bioresour. Technol.* 99: 946-953.
- Kizilkaya, R. and S. Hepsen. 2004. Effect of biosolid amendment on enzyme activities in earthworm (*Lumbricus terrestris*) casts. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 167: 202-208.
- Kizilkaya, R. and S. Hepsen. 2007. Microbiological properties in earthworm *Lumbricus terrestris* L. cast and surrounding soil amended with various organic wastes. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 38: 2861-2876.

- Klose, S. and M. A. Tabatabai. 1999. Arylsulfatase activity of microbial biomass in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63: 569-574.
- Kononova, M. M. and N. P. Belchikova. 1961. A rapid analysis of humus composition in mineral soils. *Pochvovedenie* 10: 75-87.
- Kshatriya S., G. D. Sharma, and R. R. Mishra. 1992. Enzyme activities related to litter decomposition in the forests of different age and altitude in North East India. *Soil Biol. Biochem.* 24: 265-270.
- Maboeta, M. S. and L. van Rensburg. 2003. Vermicomposting of industrially produced wood chips and sewage sludge utilizing *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56: 265-270.
- Macci, C., G. Masciandaro, and B. Ceccanti. 2010. Vermicomposting of olive oil mill wastewaters. *Waste Manage. Res.* 28: 738-747.
- Nagavallema, K. P., S. P. Wani, L. Stephane, V. V. Padmaja, C. Vineela, M. Babu Rao, and K. L. Sahrawat. 2004. Vermicomposting: Recycling wastes into valuable organic fertilizer. Global Theme on Agrecosystems Report no.8. Patancheru 502324. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Andhra Pradesh, India.
- Nannipieri, P., S. Grego, and B. Ceccanti. 1990. Ecological significance of the biological activity in soil. pp. 293-355. *In*: J. M. Bollag and G. Stotzky (eds.). *Soil Biochemistry* Vol. 6. Marcel Dekker. New York, NY, USA.
- Paul, E. A. and F. E. Clark. 1989. *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press. San Diego, CA, USA.
- Perucci, P. 1990. Effect of the addition of municipal solid-waste compost on microbial biomass and enzyme activities in soil. *Biol. Fertil. Soils* 10: 221-226.
- Perucci, P. 1992. Enzyme activity and microbial biomass in a field soil amended with municipal refuse. *Biol. Fertil. Soils* 14: 54-60.
- Pramanilk, P., G. K. Ghosh, and Y. R. Chung. 2010. Changes in nutrient content, enzymatic activities and microbial properties of lateritic soil due to application of different vermicomposts: A comparative study of ergosterol and chitin to determine fungal biomass in soil. *Soil Use Manage.* 26: 508-515.
- SAS Institute. 1998. *SAS User's guide: statistics*. SAS Institute. Cary, NC, USA.
- Satchell, J. E. and K. Martin. 1984. Phosphatase activity in earthworm faeces. *Soil Biol. Biochem.* 16: 191-194.
- Sharma, S., K. Pradhan, S. Satya, and P. Vasudevan. 2005. Potentiality of earthworms for waste management and in other uses. A review. *J. Am. Sci.* 1: 4-15.
- Simek, M. and V. Pzll. 1989. The effect of earthworms (*Lumbricidae*) on nitrogenase activity in soil. *Biol. Fertil. Soils.* 7: 370-373.
- Singh, A. and S. Sharma. 2002. Composting of a crop residue through treatment with microorganisms and subsequent vermicomposting. *Bioresour. Technol.* 85: 107-111.
- Stephens, P. M., C. W. Davoren, B. M. Doube, M. H. Ryder, A. M. Benger, and S. M. Neate. 1993. Reduced severity of *Rhizoctonia solani* disease on wheat seedlings associated with the presence of the earthworm *Aporrectodea trapezoides* (Lumbricidae). *Soil Biol. Biochem.* 25: 1477-1484.
- Stevenson, F. J. 1994. *Humus chemistry. Génesis, composition, reactions*. John Wiley and Sons. Hoboken, NJ, USA.
- Suthar, S. 2012. Earthworm production in cattle dung vermicomposting system under different stocking density loads. *Environ Sci. Pollut. Res. Int.* 19: 748-755.
- Tejada, M. and C. Benítez. 2011. Organic amendment based on vermicompost and compost: Differences on soil properties and maize yield. *Waste Manage. Res.* 29: 1185-1196.
- Tejada, M. and J. L. González. 2009. Application of two vermicomposts on a rice crop: Effects on soil biological properties and rice quality and yield. *Agron. J.* 101: 336-344.
- Toyota, K. and M. Kimura. 1994. Earthworms disseminate a soil-borne plant pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. -raphani. *Biol. Fertil. Soils* 18: 32-36.
- Trigo, D. and P. Lavelle. 1993. Changes in respiration rate and some physicochemical properties of soil during gut transit through *Allolobophora molleri* (Lumbricidae, Oligochaeta). *Biol. Fertil. Soils* 15: 185-188.
- Turgay, O. C., E. E. Erdogan, and A. Karaca. 2010. Effect of humic deposit (leonardite) on degradation of semi-volatile and heavy hydrocarbons and soil quality in crude-oil-contaminated soil. *Environ. Monit. Assess.* 170: 45-58.
- Vivas, A., B. Moreno, S. García-Rodríguez and E. Benítez. 2009. Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. *Bioresour. Technol.* 100: 1319-1326.