

**INFORME TECNICO
DE RESIDENCIA PROFESIONAL**

INGENIERIA BIOQUIMICA

TEMA

**“CARACTERIZACIÓN DE VERMICOMPOSTA Y LIXIVIADOS OBTENIDOS POR
HECES DE ANIMALES”.**

PRESENTA

NUCAMENDI VILLATORO FIDELIA

NUMERO DE CONTROL

11270021

ASESOR

Dr. JOAQUÍN ADOLFO MONTES MOLINA

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Enero-Junio 2016.

INDICE GENERA

	Pag
Índice de figuras	3
Introducción.....	4
Taxonomía de la lombriz californiana.....	6
Características de la lombriz californiana.....	7
Reproducción de la lombriz.....	8
Anatomía y fisiología de la lombriz roja californiana.....	10
Objetivos generales.....	12
Objetivos específicos.....	12
Procedimiento y descripción de las actividades realizadas.....	13
Misión.....	13
Visión.....	13
Diseño Experimental.....	14
Desarrollo Experimental.....	15
Metodología de la Extracción.....	16
Diagrama de flujo para el análisis de vermicomposta y lixiviados.....	17
Método modificado de Hoffman y Winston.....	19
Eliminación de proteína y purificación del ADN.....	19
Confirmación de la extracción del DNA mediante de electroforesis.....	20
Resultados.....	21
Discusión.....	30
Conclusiones.....	33
Beneficio del humus de lombriz.....	34
Competencias desarrolladas y aplicadas.....	35
Referencias.....	36

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pag
1	Taxonomía de la lombriz <i>Eisenia foetida</i>6
2	Ciclo de vida de la lombriz roja californiana (<i>Eisenia foetida</i>).....9
3	Características morfológicas de la Lombriz Roja Californiana (<i>Eisenia Foetida</i>)..10
4	Mapa de ubicación de Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.....14
5	Medición de longitud y diámetro..... 15
6	Diseños de bloques.....15
7	vermicomposta lavados con pirofosfato..... 18
8	Lixiviado lavado con pirofosfato.....18
9	Análisis estadístico de la longitud de lombriz.....21
10	Análisis estadístico del diámetro de la lombriz.....22
11	Análisis estadístico para determinar el número de lombrices por tratamiento.....22
12	Análisis estadístico para determinar el número de huevos por tratamientos.....23
13	Comparación de pH en los diferentes tratamientos de vermicomposta.....24
14	Comparación de pH en los diferentes tratamientos de lixiviado.....24
15	Comparación de conductividad eléctrica en los diferentes tratamientos de Vermicomposta.....25
16	Comparación de conductividad eléctrica en los diferentes tratamientos de Lixiviado.....26
17	Extracción DNA para vermicomposta.....28
18	Extracción DNA lixiviado.....28
19	Confirmación de DNA para vermicomposta.....29
20	Confirmación de DNA para lixiviado.....29
21	Tubos DNA.....31

INTRODUCCIÓN

Las lombrices de tierra son los organismos más importantes del suelo, especialmente en ecosistemas productivos, debido a su influencia en la descomposición de la materia orgánica, desarrollo de la estructura del suelo y el ciclo de nutrientes. Aristóteles las llamo “el intestino del mundo” y Charles Darwin, permaneció varios años observando la influencia que estas tenían en la formación de humus y transporte de suelo (Žaltauskaitė and Sodienė, 2014).

A nivel mundial muchos agricultores, asocian la presencia de lombrices con la calidad del suelo. Diferentes artículos agrícolas reportan beneficios en las cosechas y en la estructura del suelo como consecuencia de la presencia de las lombrices (Kui et al., 2014).

También se da la controversia sobre si las lombrices aportan beneficios al suelo o si por el contrario ellas solo están presentes en suelos de buena calidad, pues se da el caso que existen suelos sanos donde no están presentes las lombrices (Tomlin et al. 1995; Shipitalo y Gibas 2000).

De igual manera también existen evidencias que la presencia de ciertas especies y algunos de los procesos que estas realizan, podrían ocasionar efectos potencialmente negativos al suelo o a los ecosistemas, algunos de estos son: lixiviación de nitrógeno y desnitrificación, diseminación de patógenos y plagas, posible competencia con las especies de lombrices nativas (Barro 1999, Brown et al. 2000, Lavelle y Spain 2001, Hendrix y Bohlen 2002).

Las lombrices junto a las termitas, las hormigas y las larvas de algunas especies de escarabajo conforman un grupo que muchos autores han denominado “los ingenieros del suelo”, ya que causan importantes modificaciones físicas en el (galerías, hoyos y depósitos de excrementos) modificando el ambiente para otros organismos y alterando la disponibilidad de habitas y alimentos para otros animales y las plantas (Lavelle 1997, Brown et al. 2000).

En los últimos años se ha demostrado que la perdida acelerada del contenido de materia orgánica y la degradación del suelo se debe en gran parte a la destrucción de la fauna del suelo que regula estos procesos (Lavelle y Barois 1988, Lavelle 1996).

La actividad de las lombrices acelera la descomposición de los restos vegetales, incrementando la tasa de transformación de nutrientes, promueve la agregación del suelo y la porosidad, aumenta la infiltración de agua y el transporte de solutos. Estos organismos tienen una gran influencia en el ciclo de los nutrientes en muchos ecosistemas. Generalmente incrementan la mineralización del carbono en el suelo, también la pueden disminuir al contribuir a la formación de agregados estables en los cuales el carbono es protegido de futuras descomposiciones. Las excretas de

las lombrices contienen elevadas cantidades de Nitrógeno orgánico en comparación a la encontrada en los suelos adyacentes (Eliot 1990).

El efecto de las lombrices sobre la estructura del suelo resulta de la acción neta de su alimentación y la actividad de las madrigueras. Ellas ingieren partículas del suelo y materia orgánica, la mezcla de los desechos de estas dos fracciones constituyen las excretas o lo que se llama coprolitos. Una vez expulsado el suelo en forma de coprolitos puede ser erosionado debido al impacto de la lluvia o puede formar agregados sólidos estables a través de una variedad de mecanismos de estabilización.

El vermicompostaje es un método adecuado para el tratamiento de residuos sólidos orgánicos, ya que disminuye la emisión de contaminantes, produce sustancias más estables y genera un producto adecuado para el aprovechamiento en agricultura.

Por éste proceso se han tratado gran variedad de residuos sólidos orgánicos, entre ellos los residuos de la actividad ganadera que son, por importancia en cantidad de desechos, principalmente purines o estiércol.

Uno de este tipo de residuos son los diferentes tipos de estiércol, que también se emplea como fertilizante directamente con el inconveniente de los riesgos sanitarios que esta práctica conlleva; debido a que el vermicompostaje reduce en gran cantidad los posibles patógenos.

Los trabajos que estudian los cambios en las comunidades bacterianas durante el vermicompostaje, no se han enfocado a estudiar a las cepas que presentan genes de resistencia a antibióticos que sobrevivan al vermicompostaje. Por esto se presenta un campo de estudio en este punto que permitirá conocer más a fondo el proceso del vermicompostaje desde las interacciones entre las bacterias presentes.

La lombricultura es una alternativa agroecológica empleada para la transformación de residuos sólidos mediante el accionar directo de las lombrices de tierra. Es una técnica para producir abono orgánico para suelos y cultivos así como una biotecnología importante para el reciclaje de desechos sólidos y líquidos, obteniéndose beneficios ecológicos y un remanente económico. El humus de lombriz se generaliza debido a sus extraordinarias cualidades, transformándose en un insumo importante en algunas actividades como la floricultura y avanzando rápidamente en el ámbito fruti-hortícola, especialmente en los viveros y como mejorador de suelos en términos físicos, químicos y biológicos. Además es una biotecnología importante para el reciclaje de desechos sólidos y líquidos, obteniéndose beneficios ecológicos y un remanente económico, por lo que nuestras comunidades se deben capacitar a estas nuevas formas de producción de abono orgánico a partir de sus propias materias primas.

LOMBRIZ CALIFORNIANA

(*Eisenia foetida*) es una especie de lombriz de tierra del género *Eisenia*, perteneciente a la familia Lumbricidae, del orden de los haplotáxidos, perteneciente a su vez a la subclase de los oligoquetos.

Es hermafrodita incompleta (tiene ambos sexos, pero para reproducirse ha de aparearse). Está dotada de cinco corazones y seis pares de riñones.

La lombriz roja californiana es una de las muchas variedades de lombrices obtenidas mediante cruces para su empleo en lumbricultura. La especie es *Eisenia foetida* (con otra grafía, *Eisenia fétida*), de la familia Lumbricidae. A pesar de ser una especie europea, se le llama «californiana» porque fue en California donde se empezó a prestar atención a su efecto beneficioso para el mantillo.



FIGURA 1: TAXONOMIA DE LA LOMBRIZ EISENIA FOETIDA.

Son criadas en cualquier lugar donde las temperaturas no superen los 40 °C y se dé al menos una temporada con un promedio inferior, siendo los climas templados los ideales para su reproducción.

Estas lombrices alcanzan la máxima capacidad de reproducción entre los 14 y los 27 °C; se reproducirán menos durante los meses más cálidos y durante los más fríos. Cuando la temperatura es inferior a 7 °C, las lombrices no se reproducen; pero siguen produciendo abono, aunque en menor cantidad de lo habitual.

El *compost* (*humus* de lombriz) que produce sirve como excelente fertilizante para praderas, huertas y árboles frutales.

Las lombrices adultas pesan de 0,24 hasta 1,4 gramos, comiendo una ración diaria que tiende a su propio peso; de ella, un 55% se traduce en abono, lo que hace muy

interesante en su caso la lombricultura (incluso si consideramos la carne de lombriz producida a partir de desperdicios).

Características

Color rojo oscuro

- Respiración cutánea
- Mide de 6 a 8 cm de largo, de 3 a 5 mm de diámetro, y pesa hasta aproximadamente 1,4 g
- No soporta la luz solar: una lombriz expuesta a los rayos del sol muere en unos pocos minutos
- Vive aproximadamente unos 4,5 años, y puede llegar a producir, bajo ciertas condiciones, hasta 1.300 lombrices al año
- La lombriz californiana avanza excavando en el terreno a medida que come, depositando sus deyecciones y convirtiendo ese terreno en uno mucho más fértil que el que pueda lograrse con los mejores fertilizantes artificiales
- Los excrementos de la lombriz contienen:
 - 5 veces más nitrógeno
 - 7 veces más fósforo
 - 5 veces más potasio
 - 2 veces más calcio

Que el material orgánico ingerido.

- En cautiverio tiene una vida media de 4 años.
- No contrae enfermedades ni las transmite.
- En estado adulto pesa aproximadamente 1 gramo, y come el equivalente a su peso diariamente.
- La extraordinaria capacidad reproductiva de la lombriz roja de California permite al lombricultor amortizar el capital invertido en un plazo razonable de tiempo.
- En un criadero de lombriz roja de California en fase de expansión, el número de ejemplares se duplica cada tres meses, es decir, 16 veces en un año, 256 veces en dos años y 4.096 veces en 3 años.

- **Reproducción**

La lombriz vive aproximadamente unos 16 años, durante los cuales se acopla regularmente cada 7 días, si la temperatura y la humedad del medio son su de agrado, la Lombriz Roja alcanza su madurez sexual a los 3 meses de edad, Es hermafrodita incompleta por lo que no está en condiciones de autofecundarse; consecuentemente, como resultado del acoplamiento de dos lombrices, se producirán dos huevos o cápsulas (uno de cada lombriz). Estas cápsulas se abrirán al cabo de 12 a 21 días, según la temperatura del medio donde se ubiquen.

Cada huevo o cápsula contiene de 2 a 21 pequeñas lombrices. Cada lombriz está dotada de un aparato genital masculino y de un aparato genital femenino. El aparato genital masculino está integrado por los testículos que son glándulas secretoras de esperma. Se encuentra muy cerca de la boca. El aparato genital femenino recibe el esperma y lo retiene hasta el momento de la fecundación; este aparato se encuentra en una posición relativa posterior al aparato genital masculino.

Dos lombrices en fase de acoplamiento giran en sentido opuesto la una de la otra, de esta manera, puede contactar el aparato genital masculino de una con el aparato genital femenino de la otra. Así, en cada acoplamiento, una lombriz recibe el esperma de la otra y lo retiene en su propio aparato genital femenino hasta la fecundación.

La fecundación se efectúa a través del clitelo, cuyas glándulas producen el huevo o cápsula, ésta tiene un color amarillo verdoso, con unas dimensiones aproximadas de 2-3 por 3-4 mm, no siendo por lo tanto redonda sino teniendo una forma parecida a una pera muy pequeña, redondeada por una parte y acuminada por la otra. Por esta última emergen las lombrices después de 14 a 21 días de incubación.

En el momento del nacimiento, las crías rompen la envoltura que ha adquirido un color más oscuro. De un huevo pueden nacer entre 2 y 21 pequeñas lombrices, esto depende del manejo que se le esté dando al Lombricultivo (alimentación, acidez del medio, humedad, temperatura, etc.). Hago especial hincapié aquí, en que uno de los factores fundamentales que ha de seguir el lombricultor inexperto es el control constante de la temperatura, de los hábitáculos de las lombrices.

Las condiciones del medio deben ser óptimas, ya sea para la producción del humus, o para la actividad sexual. Una buena temperatura del medio inmediato oscila alrededor de 19 - 20°C. Los climas templados, como el de la zona cafetera son los ideales para el cultivo de la lombriz. Así mismo es muy importante el manejo que se le dé al Lombricultivo como es una comida idónea, agua de calidad y en la cantidad necesaria.

Dos lombrices pueden producir, cada una, en condiciones normales, unas 1.500 lombrices al año, por lo tanto una pareja dará lugar a unas 3.000 lombrices.

Entonces con un buen manejo cada pareja se acopla semanalmente; cada 14 días las cápsulas se rompen dando lugar a 20 lombrices recién nacidas que a los tres meses ya serán sexualmente maduras y éstas a su vez se irán multiplicando entre sí.

Desde el mismo momento de su nacimiento, las lombrices son autosuficientes; comen solas y solo necesitan para sobrevivir que el sustrato donde se encuentran sea lo suficiente húmedo y tierno para ser perforado por su minúscula boca.

Las lombrices al nacer son blancas, a los cinco o seis días son rosadas y a los 15 días o 20 son de color rojo oscuro.

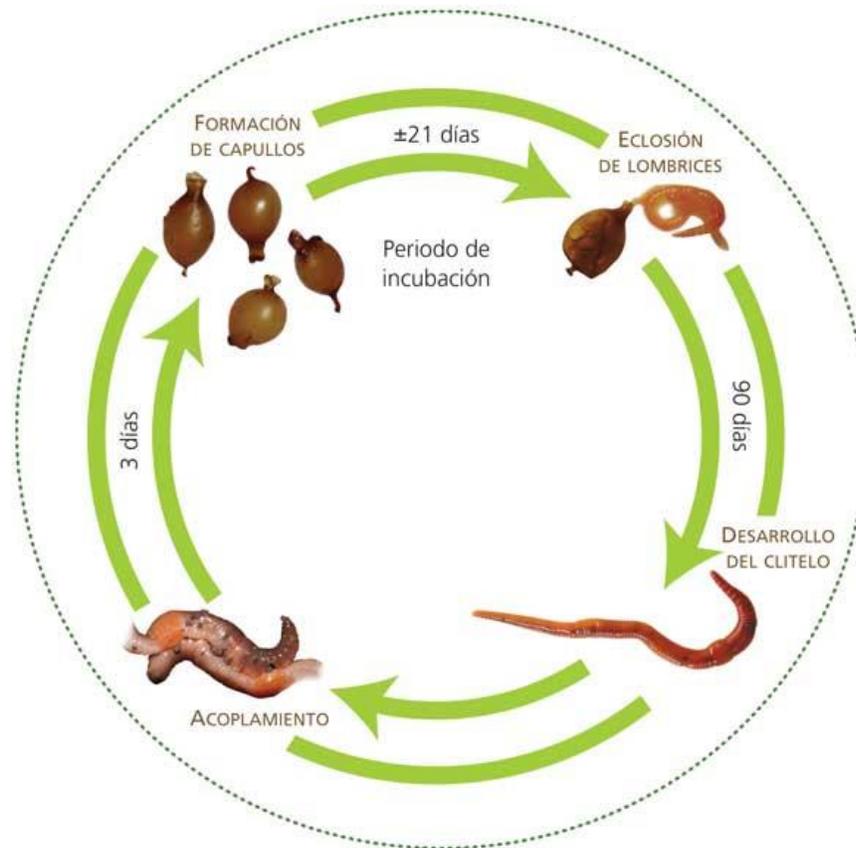


FIGURA: 2 CICLO DE VIDA DE LA LOMBRIZ ROJA CALIFORNIANA (*Eisenia foetida*)

Anatomía y fisiología de la lombriz roja californiana

Características morfológicas: La pared del cuerpo de las lombrices está constituida de afuera hacia adentro, por:

Cutícula: lámina muy delgada de un color marrón brillante.

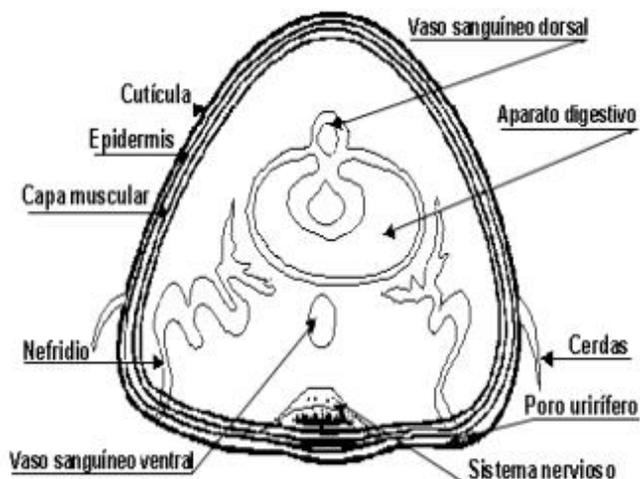
Epidermis: Epitelio simple con células glandulares que producen una secreción mucosa; también células glandulares que producen una secreción serosa.

Capas musculares: Son dos una circular externa y una longitudinal interna.

Peritoneo: Capa más interna que limita exteriormente con el celoma de la lombriz

Celoma: Cavidad que contiene liquido celómico; dentro de este se suspenden los órganos internos del animal, se extiende a lo largo del cuerpo y envuelve el canal alimentario.

Clitelo: Es un claro abultamiento glandular ubicado en la parte anterior del cuerpo, y se caracteriza por secretar una sustancia que forra las capsulas para alojar los huevos aparece solo en la lombrices adultas y representa la madurez sexual.



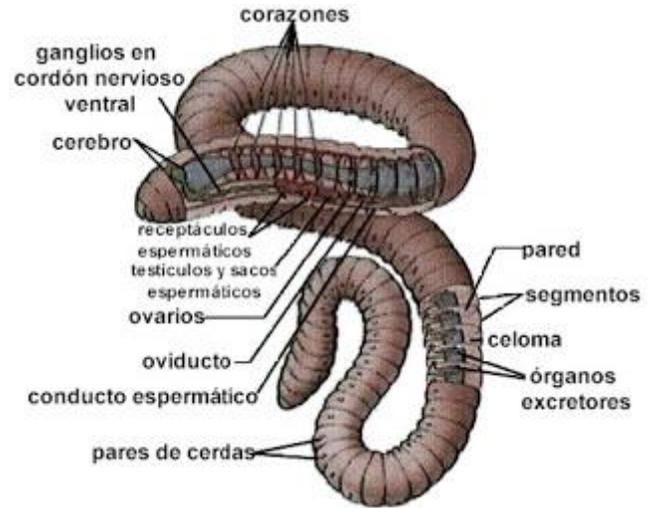
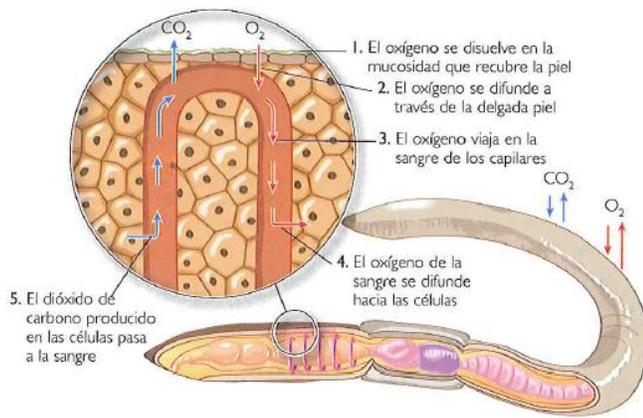


Figura 3: Características morfológicas de la Lombriz Roja Californiana (*Eisenia Foetida*)

La lombriz humedece el alimento con secreciones semejantes a la saliva, procedentes a la región bucal, y luego lo engulle por acción muscular del prosoma (labios) y la faringe. Los ácidos orgánicos del alimento se neutralizan por el carbonato de calcio secretado por las glándulas calcíferas del esófago, por lo cual el alimento digerido es de reacción alcalina.

Objetivos

Objetivos generales

Evaluar los diferentes sustratos transformados por la lombriz roja californiana.

Objetivos específicos

- 1.-valorar las características físico-químicas de vermicomposta y lixiviados obtenidos por vermicomposteos.
- 2.- evaluar las características de las lombrices cultivadas en los diferentes sustratos de heces de animales.
- 3.-extracción de ADN a partir de las vermicompostas y lixiviados producidos en el vermicomposteo.

PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

Las actividades experimentales se llevaron a cabo dentro del instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

Las áreas específicas se citan a continuación:

- Invernadero del instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.
- Laboratorio de biotecnología vegetal del instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

A continuación se describe información de la institución

MISIÓN

Formar de manera integral profesionistas de excelencia en el campo de la ciencia y la tecnología con actitud emprendedora, respeto al medio ambiente y apego a los valores éticos.

VISIÓN

Ser una institución de excelencia en la educación superior tecnológica del sureste, comprometida con el desarrollo socioeconómico sustentable de la región.

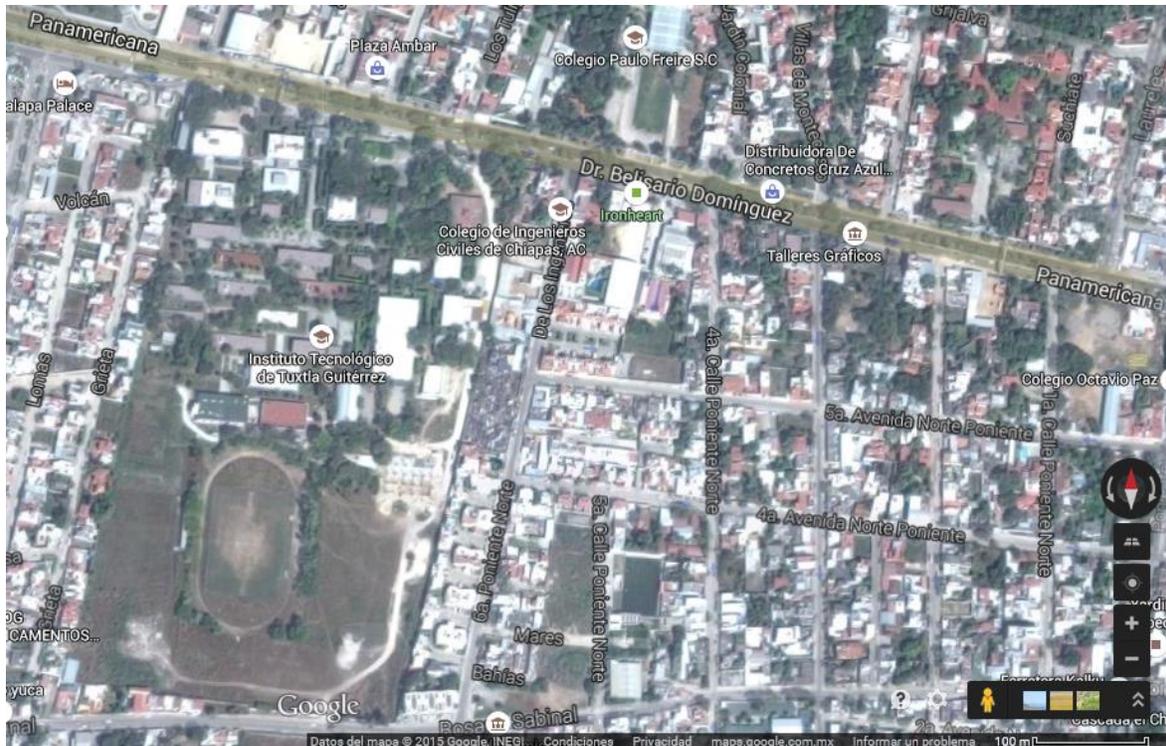


Fig. 4. Mapa de ubicación de Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

Coordenadas 16° 46' 0" N, 93° 5' 0" W

DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño tratamental de las lombrices fue un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones, la unidad experimental estuvo formada por un recipiente de PVC de 40 cm de largo x 30 cm de ancho x 20 cm de profundidad, en la cual se dispusieron 10 lombrices, el sustrato se componía de 40% bagazo de caña y 30% heces secas de (cerdo, cabra, conejo y vaca) y 30% de suelo, los tratamiento fueron humectados: por agua potable, las variables que se midieron fueron: longitud, diámetro, huevos y N° de lombrices.

Desarrollo del experimento

Vermicompostaje:

Eisenia foetida se crió en una cama de suelo, la cual estaba compuesta por: 30% de estiércol de cerdo, cabra conejo, vaca, un 40% de bagazo de caña y 30% de suelo, se adicionaron 10 lombrices. Se manejó a temperatura ambiente con una humedad del 70% aproximadamente. Se agregó sustrato nuevo cada 30 días y se humectó cada 3 días. Después se dejaron desarrollar y reproducir, posteriormente fueron contadas y se les midió su longitud y diámetro.



Figura 5: Medición de longitud y diámetro



Figura 6: diseño en bloques

“METODOLOGIA DE LA EXTRACCIÓN”

SIMBOLOGIA

A=Agua corriente

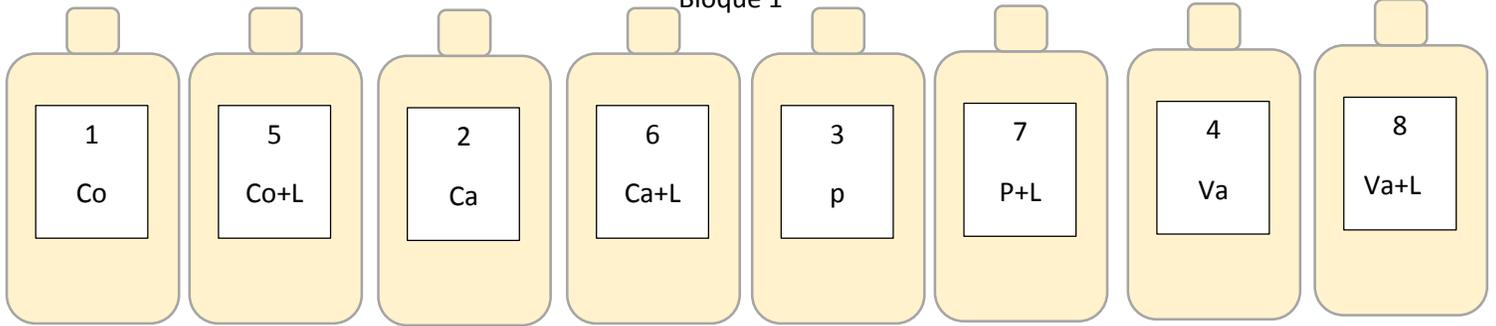
P=puerco

Ca=cabra

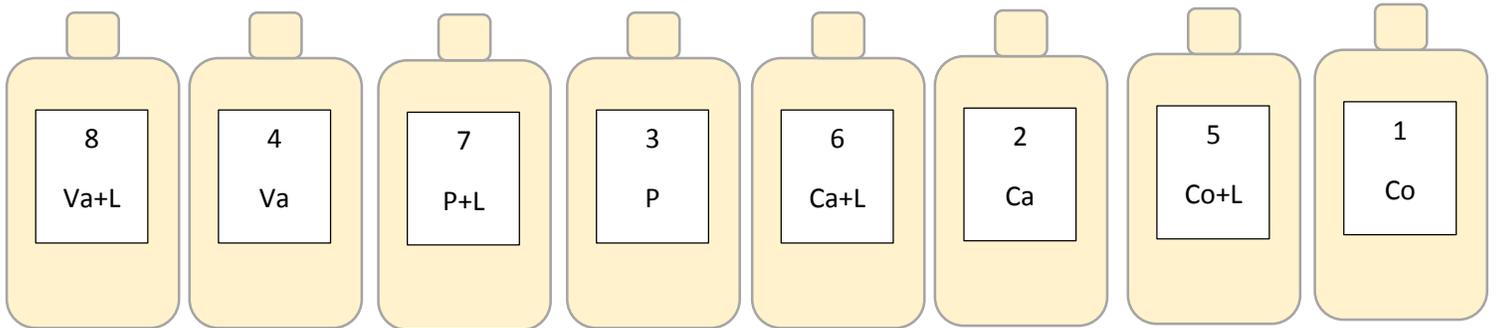
Co=conejo

Va=vaca

Bloque 1



Bloque 2



Bloque 3

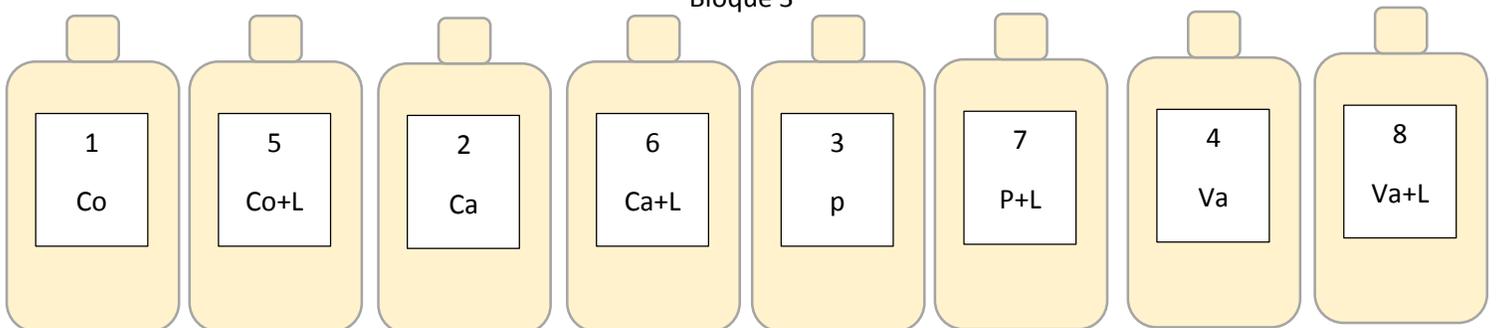
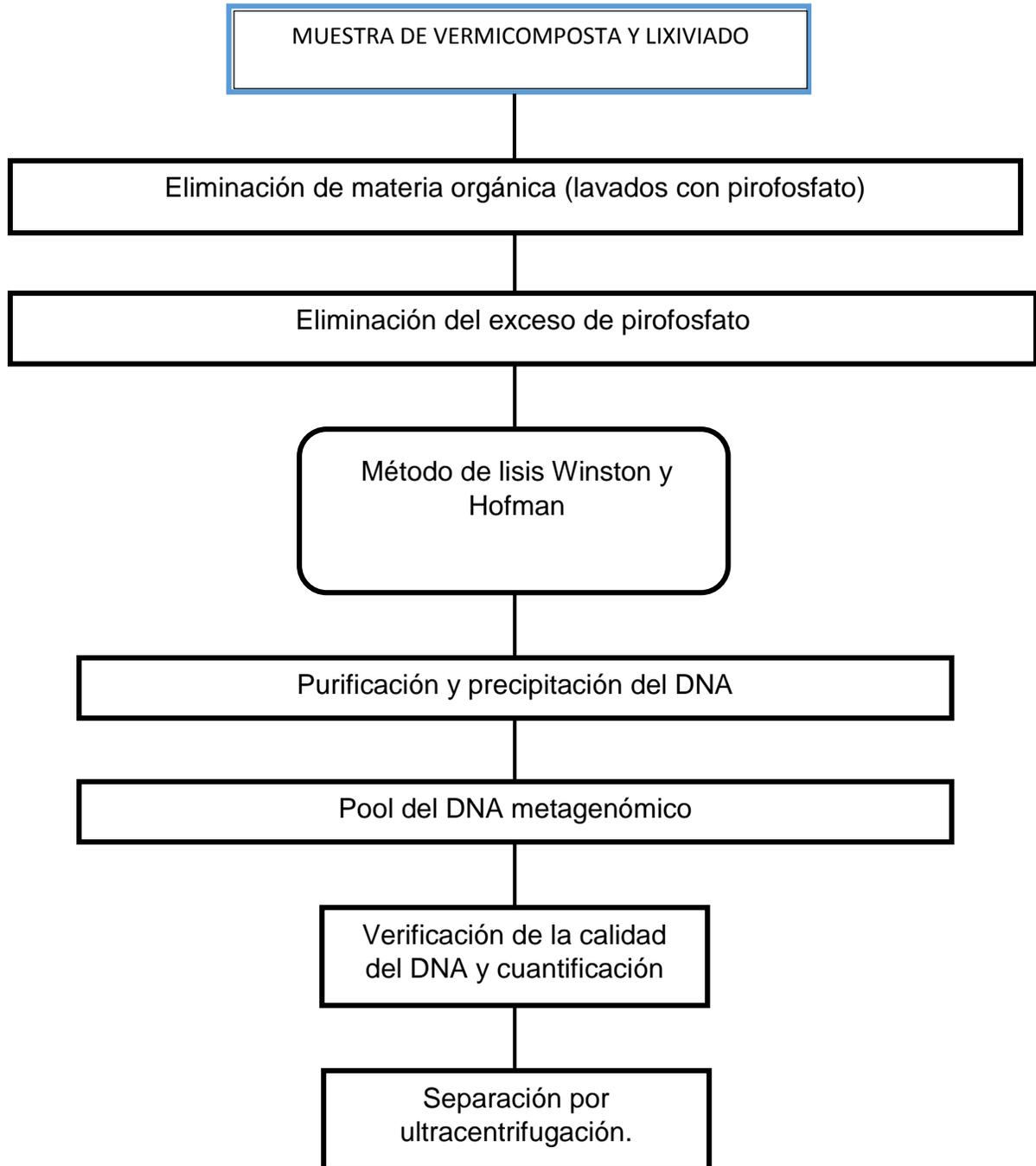


DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL ANALISIS DE VERMICOMPOSTAS Y LIXIVIADOS



Metodología de extracción

Eliminación de la materia orgánica.

- 1.- Se pesaron 0.25 y 0.5 gr de vermicomposta y se colocaron en tubos eppendorf.
- 2.- Se adiciono 5 ml de pirofosfato de sodio al 0.15 M al tubo y agitar en vortex por 5 min. Hasta resuspender perfectamente.
- 3.-Se llevó a la ultracentrífuga a 4500 rpm por 10min.
- 4.-Eliminar el sobrenadante. Repetir los pasos 2 y 3 hasta que el sobrenadante sea transparente.

Eliminación del exceso de pirofosfato.

- 4.-Se adiciono 5 ml de Buffer de fosfato de sodio pH 8 y agitar en vortex hasta resuspender.
- 5.-Centrifugar y eliminar el sobrenadante. Repetir el lavo 4 veces.

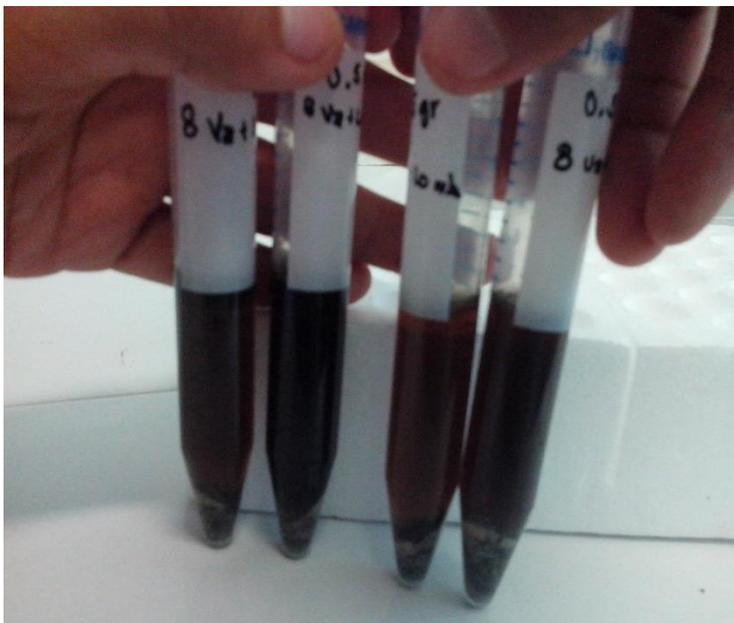


Figura 7: vermicomposta lavados con pirofosfato.

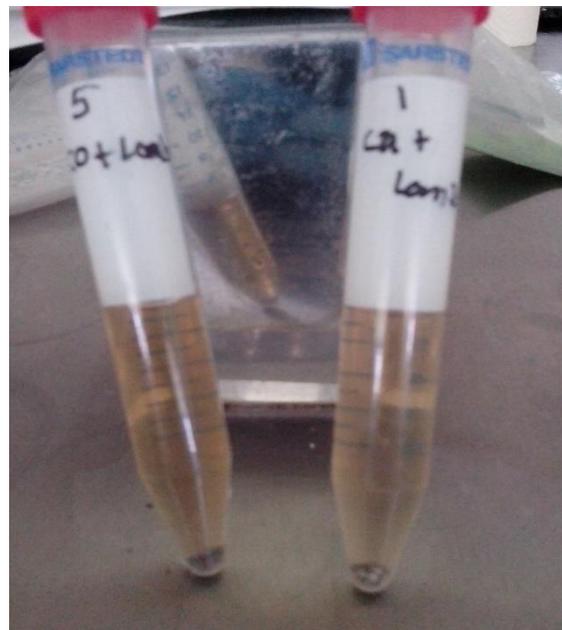


Figura 8: Lixiviado lavados con pirofosfato.

Método modificado de Hoffman y Winston.

- 1.- agregar 1200 μ l de solución lisis de Winston, un volumen de arena estéril y resuspender la vermicomposta agitando en vortex.
- 2.-Agitar los tubos en vortex a la velocidad máxima durante 15 min.
- 3.-Centrifugar a 4000 rpm por 10 min.
- 4.-Se recupera 1 ml del sobrenadante.

Eliminación de proteínas y purificación del DNA.

- 1.-Agregar 200 μ l de EDTA 0.5 M pH 8 y del volumen final 100 μ l de volumen de acetato de potasio 5 M pH 5.
- 2.-Inubar 30 min a 4°C.
- 3.-centrifugar a 13,000 rpm a 4°C por 10 min. Transferir sobrenadante (que contiene el DNA) a un tubo nuevo.
- 4.-Hacer extracción con 400 μ l de la solución de cloroformo: alcohol-isoamílico 24:1, agitar en vortex a la máxima velocidad.
- 5.-centrifugar 13,000 rpm por 10 min a T° ambiente. Transferir la fase acuosa a un tu nuevo.
- 6.-Se lavan 3 veces, en cada lavado se lleva al vortex y posteriormente a la ultracentrífuga.
- 7.-Se recupera 1 ml de cada lavado.
- 8.-Al sobrenadante se le agrega 700 μ l PEG 13%.
- 9.-Incubar a -4 °C toda la noche.
- 10.-recuperar PEG.
11. Dejar secar la pastilla (aprox. 10 min).
- 12.- se le agrega 25 μ l de Agua pisa.

➤ Confirmación de la extracción del DNA mediante electroforesis.

Concluidos los procesos de extracción, es necesario verificar la extracción del DNA mediante electroforesis con 4 μ l de muestra y 2 μ l de Ciber Green.

Para ello se llevan a cabo los siguientes pasos:

1. Preparar el molde donde se formará el gel con los peines apropiados para añadir la agarosa fundida. Colocarlo en una superficie horizontal y poner cinta adhesiva por la parte anterior y posterior para evitar que se derrame el gel. Comprobar que los dientes de los peines no llegan a tocar la bandeja.
2. Preparar la solución del gel de agarosa al 0.8% en un frasco de vidrio de 100 ml.
3. Licuar en microondas y vigilar constantemente para que no se derrame la solución. Se recomienda emplear una potencia intermedia. Puede agitarse suavemente de vez en cuando para realizar una fusión más uniforme.
4. Retirar el frasco con el gel fundido del microondas y dejar enfriar un poco.
5. Vaciar en el molde una cantidad razonable, de manera que el gel no esté muy delgado ni exceda la base de los dientes de los peines.
6. Una vez solidificado el gel, retirar las cintas adhesivas y colocar la bandeja sobre la cubeta de electroforesis.
7. Rellenar la cubeta de electroforesis con el electrolito de cubeta (TAE 1X) hasta que el gel quede sumergido completamente y retirar los peines.
8. Agregar en cada pocillo una mezcla de 3 μ l de muestra y 1 μ l de Ciber Green.
9. El gel de electroforesis para el DNA genómico se correrá por 60 minutos a 80V.
10. Revelar el gel en espectrofluorómetro para confirmar la extracción.

RESULTADOS

En las siguientes graficas se muestra el análisis estadístico para las variables de crecimiento de la lombriz *Eisenia foetida*, utilizando el programa de Startgraphics, con un error de 0.05 %, letras iguales no hay diferencia significativa.

Determinación de anova para los datos de la variable longitud de lombriz, en los tratamientos de diferentes heces de animales (figura 9).

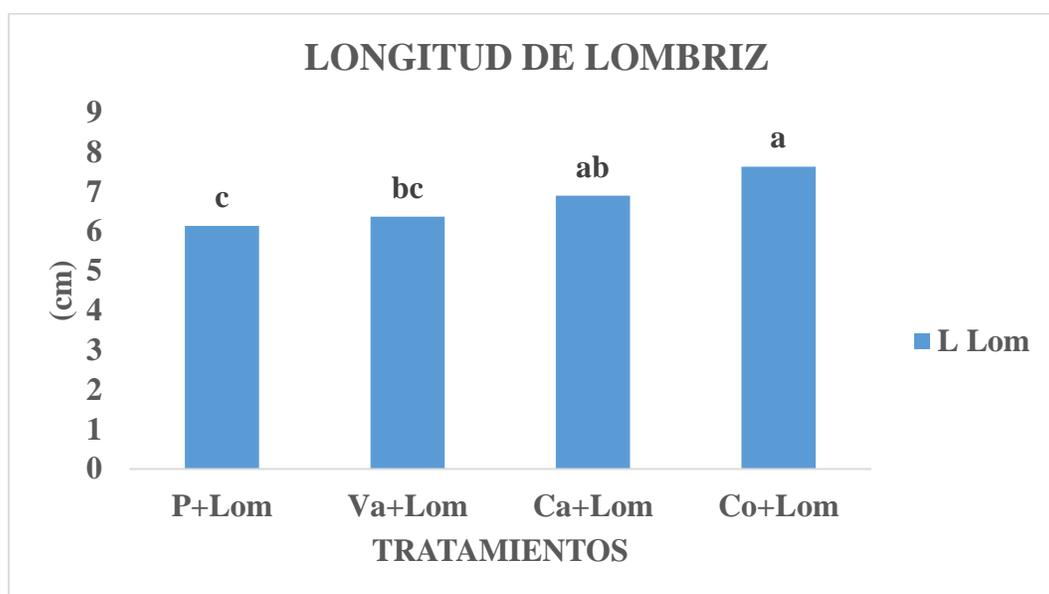


Figura 9. Análisis de anova simple para la variable longitud de lombriz (*Eisenia foetida*).

Determinación de anova para los datos de la variable del diámetro de la lombriz, en los tratamientos de diferentes heces de animales (figura 10).

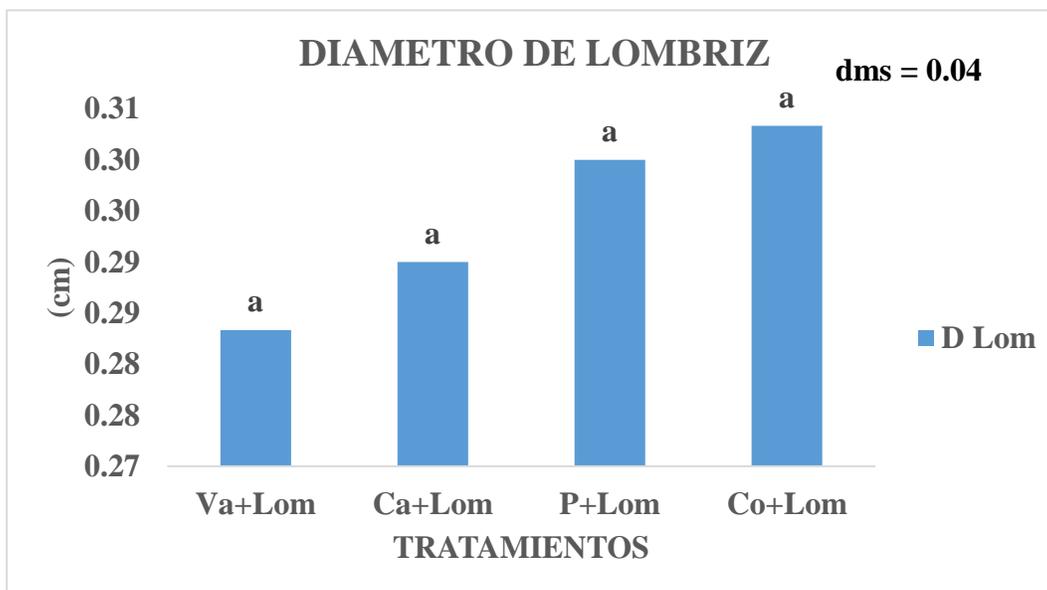


Figura 10. Análisis de anova simple para la variable del diámetro de lombriz (*Eisenia*

Las lombrices puestas en heces de conejo mostraron mayor diámetro, con respecto a las lombrices puestas en heces de puerco, cabra (4 %) y vacuno (7 %).

Determinación de anova para los datos de la variable número de lombrices en los tratamientos de diferentes heces de animales (figura 11).

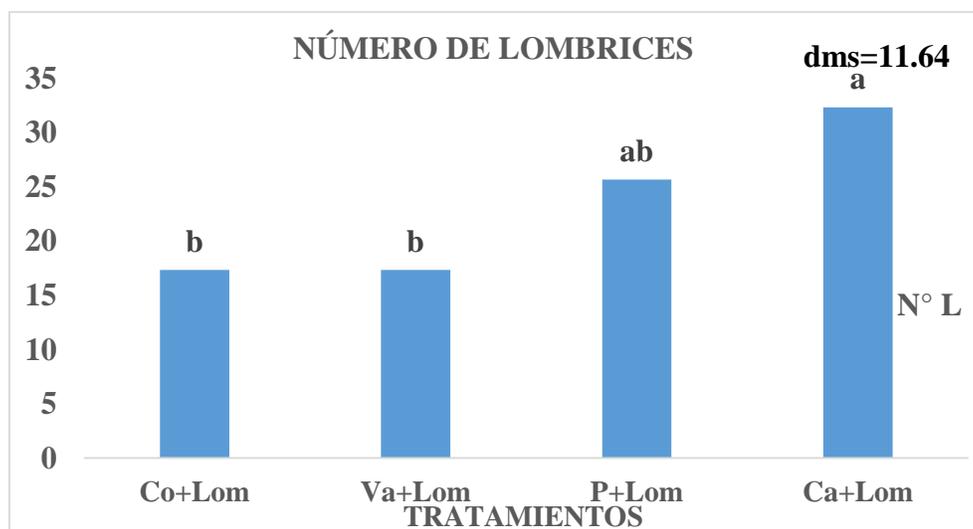


Figura 11. Análisis de anova simple para determinar número de lombrices de cada tratamiento.

En la figura 11 el análisis de varianza simple indica que al comparar los diferentes tratamientos existe diferencia estadística significativa en el tratamiento de heces de Ca+ Lom con respecto a las lombrices puestas en heces de conejo (Co) y Vacuno (Va).

DISCUSIONES

(Defrieri et al 2005) El crecimiento y reproducción de la lombriz *E. foetida* están directamente relacionados con el tipo de sustrato en el cual vive y se desarrolla. El tipo de sustrato en que crecen las lombrices influye tanto en el peso como en su reproducción, ya que cada tratamiento actúa diferente.

Estiércol de Cabra: Es el mejor estiércol que podemos aplicar pues debido a la cantidad de nutrientes y minerales que contiene, 300 kg equivalen a 1000 kg de estiércol vacuno.

Estiércol de Vaca: Es uno de los más utilizados pero no aporta los nutrientes necesarios.

Estiércol de conejo: este contiene alto contenidos salinos y nitrógeno, que puede llegar hasta aproximadamente 2%, esto hace necesario los riegos y volteos frecuentes, previos al alimento, de las lombrices. Produce un lombrihumus de aceptable calidad, dependiendo de la calidad de alimento ofrecida.

Determinación de anova para los datos de la variable números de huevos en los tratamientos de diferentes heces de animales (figura 12).

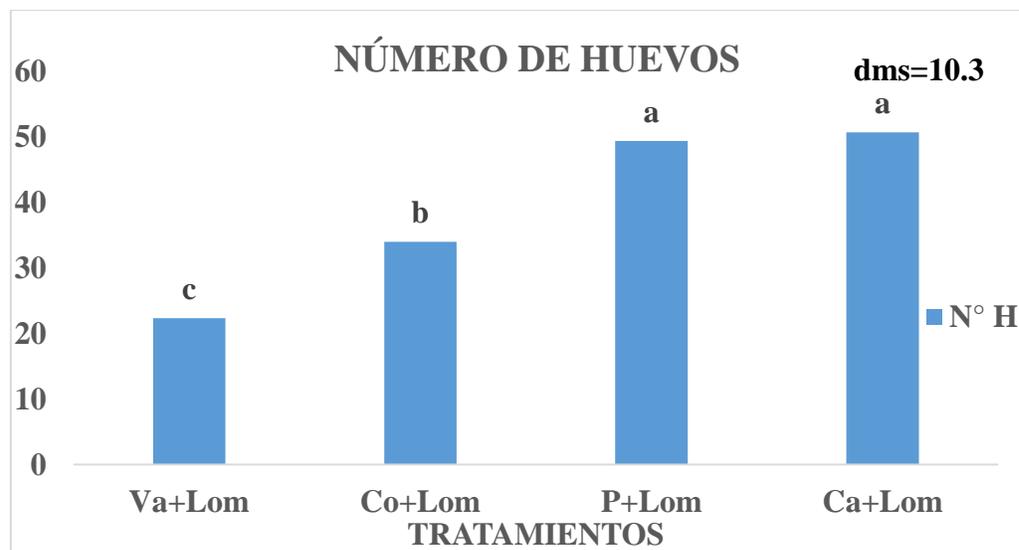


Figura 12. análisis estadístico para determinar el número de huevos de las lombrices *Eisenia Foetida*.

De acuerdo a los resultados estadísticos obtenidos como se muestra en la figura 12 podemos decir que los tratamientos de heces de Ca+Lom, P+Lom hay diferencia estadística significativa, con respecto a los tratamientos de lombrices con heces de Ca+Lom. Entre los tratamientos Va+Lom y Co+Lom. También mostraron diferencia significativa entre estos dos últimos tratamientos,

Determinación de anova para los datos de la variable de pH en vermicomposta y lixiviado en diferentes heces de animales (figura 13 y 14).

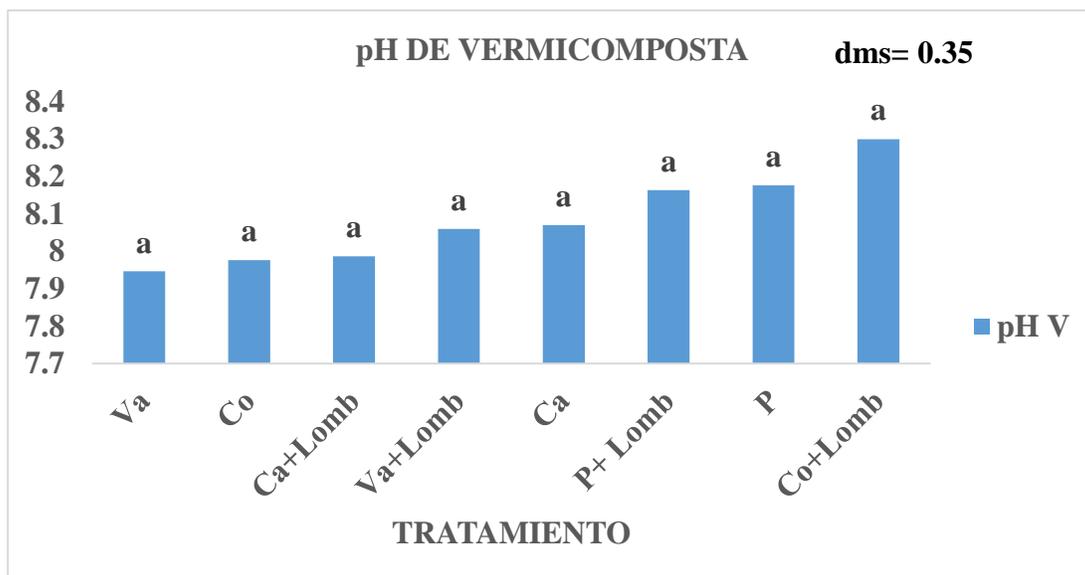


Figura 13. Comparación de pH en los diferentes tratamientos de vermicomposta.

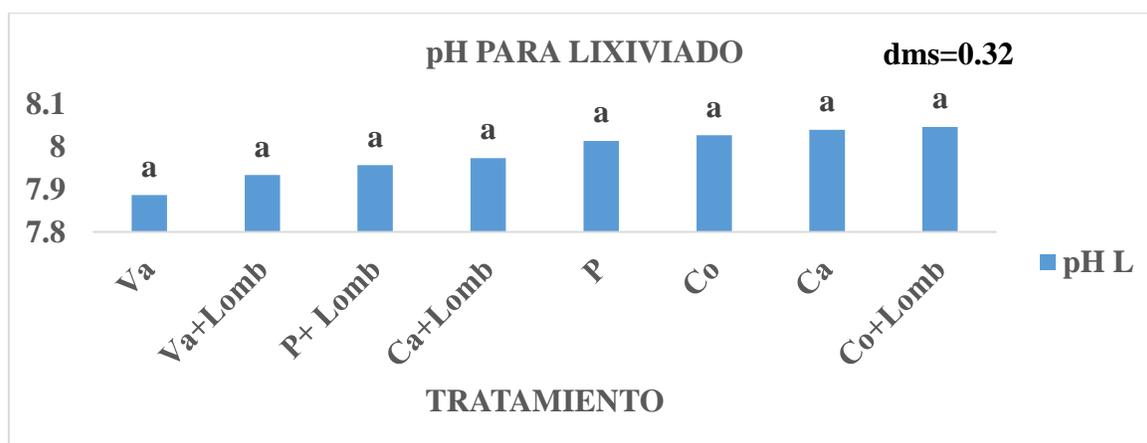


Figura 14. Comparación de pH en los diferentes tratamientos de lixiviado.

En las figuras 13 y 14 de las variables pH de vermicomposta y lixiviados no muestra diferencia significativa con respecto al resto de los tratamientos

DISCUSIÓN

Según Martínez, (2001). Informo que el grado de acidez para las lombrices composteras oscila entre 6 y 8, considerándose ideal el neutro o cercano a 7. Un grado de acidez mayor o menor puede ocasionar la muerte al animal experimentalmente los resultados obtenidos en nuestra investigación coinciden con lo obtenido con Martínez en 2001.

Según nuestros resultados obtenidos podemos utilizar para obtener más huevos los tratamientos de lombrices en heces de puerco y cabra.

Determinación de anova para los datos de la variable en conductividad eléctrica para vermicomposta y lixiviado en los tratamientos de diferentes heces de animales (figuras 15 y 16).

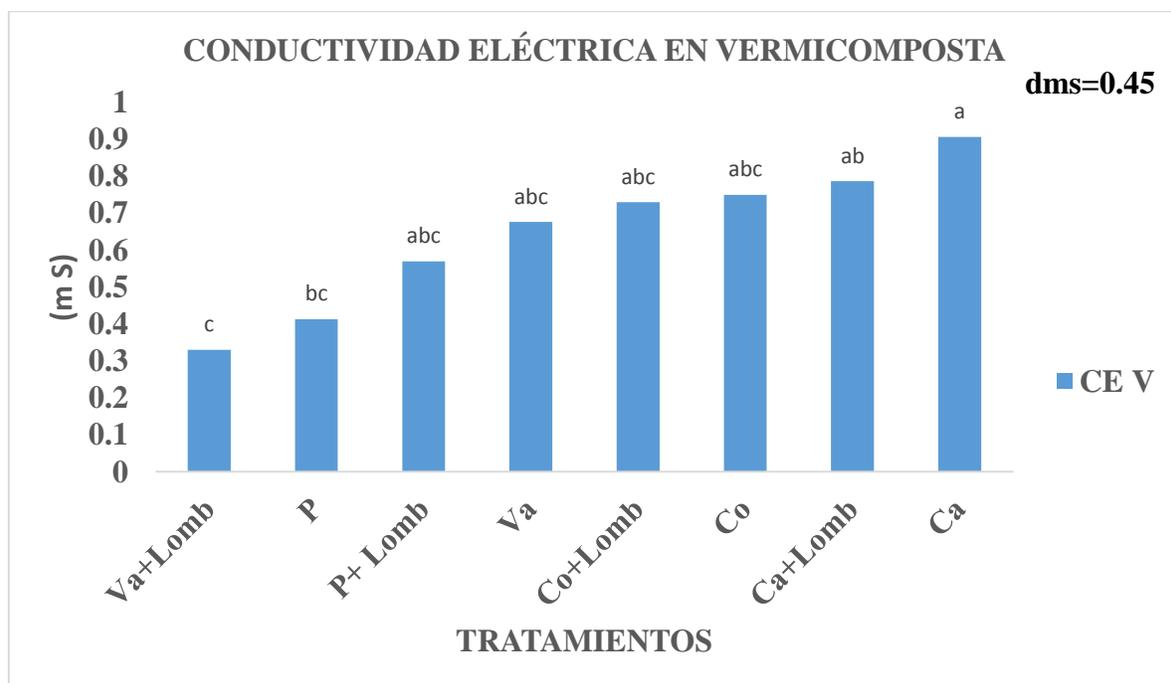


Figura 15. Análisis estadístico de conductividad eléctrica en los diferentes tratamientos de vermicomposta.

En la figura 15 se muestra que si existe diferencia estadística significativa en los diferentes tratamientos, entre las heces de P+Lom, Va, Co+Lom y Co no hay diferencia estadística significativa. Podemos decir que entre los tratamientos restantes si hay diferencia significativa pero concluyendo que para conductividad eléctrica en vermicomposta el tratamiento con heces de Ca es el mejor.

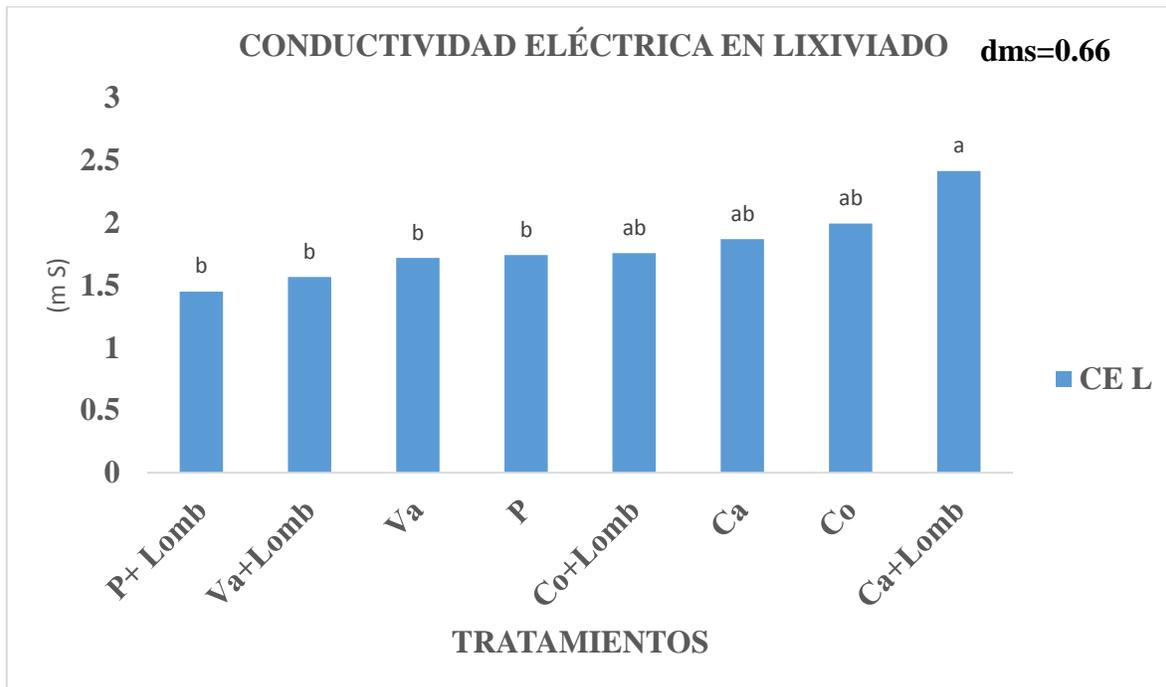


Figura 16. Análisis estadístico de conductividad eléctrica en los diferentes tratamientos de lixiviado.

En la figura 16 se muestra que si hay diferencia estadística significativa en los diferentes tratamientos entre las heces de P+Lom, Va+Lom, Va, P no hay diferencia estadísticamente significativa. En los tratamientos restantes si hay diferencia significativa, pero concluyendo que para conductividad eléctrica en lixiviados el tratamiento con heces de Ca+Lom es el mejor.

DISCUSIÓN

Según Ferruzzi, 1986 Y Reeh, 1992, informaron que la lombriz roja Californiana es la más utilizada en la lombricultura porque humifica en 24 horas (tiempo que demora su proceso digestivo) una cantidad de materia orgánica equivalente a su propio peso, aunque algunos autores han reportado que solo humifica 25 % de está y excreta 60 % de lo que consume. Este proceso se inicia con la fragmentación y mineralización enzimática del material consumido en el intestino de la lombriz, obteniéndose fragmentos de moléculas orgánicas complejas, nitrógeno y minerales en la molleja.

Según Martínez, 1999; Capistran et al., 1999 informan que la característica más importante de la lombricomposta es su alta carga microbiana, principalmente bacterias, actinomicetos y hongos. Los anteriores son intensos generadores de enzimas, antibióticos, vitaminas y precursores de muchos otros compuestos complejos. Un grupo microbiano de importancia ecológica y económica son los microorganismos fijadores de N_2 de vida libre, en el lombricomposteo estos fijadores se han encontrado en concentraciones mayores a las halladas durante el composteo.

Según Bellapart, 1996 informo que el análisis del humus de lombriz revela un enriquecimiento en minerales, convertibles o asimilables si los comparamos con la comida que han tomado las lombrices: contienen 2 veces más de calcio, 11 veces más de potasio, 3 veces más de magnesio. Los nitratos aumentan 5 veces y los fosfatos 7 veces. Todos estos minerales procederán del suelo en que viva la lombriz, y que este animal los pasa de la forma insoluble o no disponible a una forma soluble o disponible, o pueden proceder de la materia orgánica en descomposición. La cantidad de enzimas es 5 veces superior a la que contiene el estiércol normal y la carga bacteriana de un estiércol normal es del orden 10^5 - 10^6 microorganismos/gramo, mientras que la carga bacteriana de un humus de lombriz es del orden de 10^{10} - 10^{12} microorganismos/gramo.

Mejora y aumenta la disponibilidad de los nutrientes para las plantas. El agua que atraviesa la tierra se llevaría los nutrientes solubles, sino fuera porque los complejos arcillo-húmicos retienen, por atracción electrostática, los elementos necesarios para la vida de las plantas (Mg, K, Na, etc.). De esta forma, los complejos arcillo-húmicos se comportan como un almacén de nutrientes, de los que la planta puede disponer cuando le son necesarios.

Determinación de anova para los datos de la variable extracción DNA para vermicomposta y lixiviado en los diferentes tratamientos de heces de animales (figura 17 y 18).

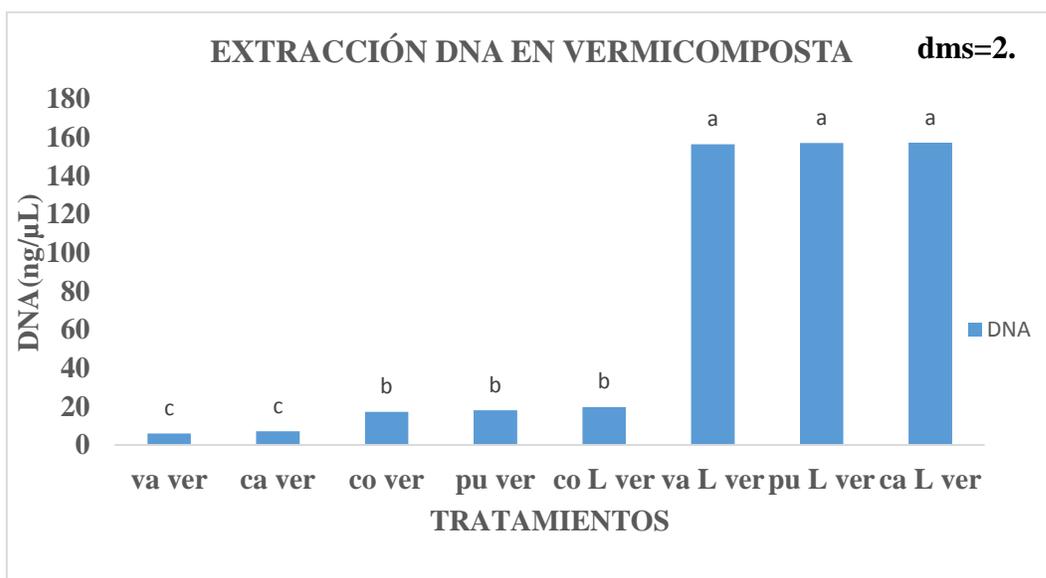


Figura 17. DNA para vermicomposta.

En la figura 17 se muestra diferencia estadística significativa entre los diferentes tratamientos, entre la heces de Va y Ca no hay diferencia significativa. Al igual que en las heces de Co, P y Co+Lom no existe diferencia estadísticamente significativa. Concluimos que en las heces de Va+Lom, P+Lom y Ca+Lom son los mejores tratamiento para la extracción de DNA para vermicomposta.

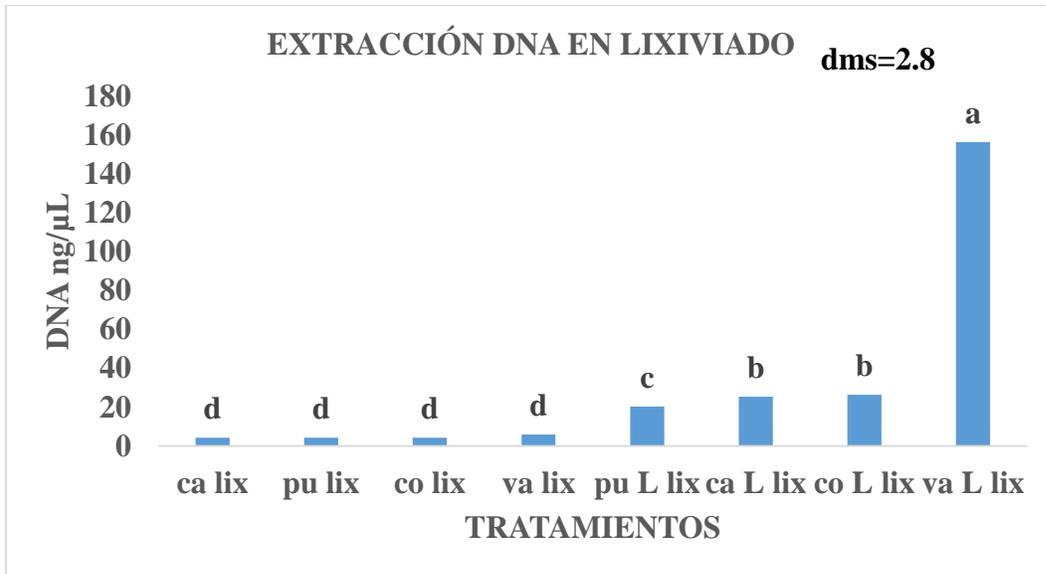


Figura 18. DNA para lixiviado

En la figura 18 se muestra diferencia estadística significativa en todos los tratamientos, entre las heces de Ca, P, Co y Va no existe diferencia significativa, para el tratamiento Ca+Lom y Co+Lom no existe diferencia pero hubo mayor porcentaje de DNA en el tratamiento Va+Lom.

Se pudo confirmar la extracción de ADN en los diferentes tratamientos de vermicomposta y lixiviado.

Nota: El Ciber Green es fotosensible, protegerlo siempre de la luz. Mantener los tubos con DNA en hielo.

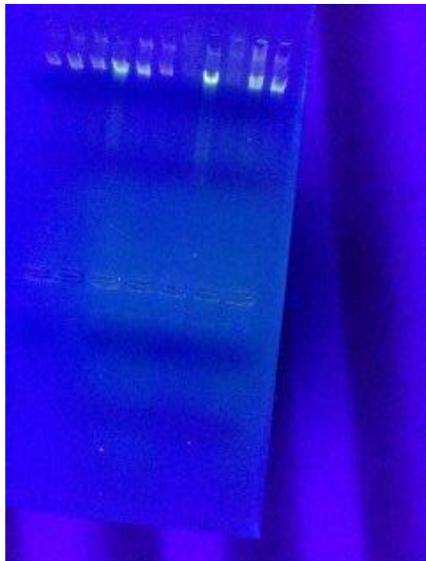


Figura 19: confirmación de DNA vermicomposta.



Figura 20: confirmación de DNA lixiviado.

Se seleccionó 1 tratamiento de cada uno de las muestras y se comprobó la existencia de ADN para ello utilizamos 2 μ l syber por muestra y 4 μ l ADN.

Para la cuantificación en el nanodrop se utilizó 2 μ l de cada una de las muestra de ADN.



Figura 21: Tubos con DNA

DISCUSIÓN

Como puede apreciarse los resultados de las gráfica 9 y 10 la calidad de ADN es mejor en los tratamientos que contiene heces (cabra, vaca y puerco + lombrices

californianas (*Eisenia foetida*). En el caso de los lixiviados los mejores resultados de ADN se observan en cabra, conejo y vaca + Lom californiana.

Existen algunos reportes sobre el uso de Ácidos Húmicos extraídos de mezclas de lombricompostas de excretas animales y otros residuos orgánicos. En un estudio fueron extraídos los AH de un producto comercial de humus de cerdo usando un procedimiento clásico álcali: ácido y se mezclaron con un medio comercial sin suelo, que contenía cantidades recomendadas de nutrimentos para asegurar el adecuado crecimiento de las plantas. Los niveles de AH empleados fueron de 0 hasta 4000 mg de AH/kg de peso seco del medio comercial para germinar semillas de tomate. Los resultados mostraron que el rendimiento fue mayor con concentraciones de AH entre 200-500 mg/kg de medio en el peso seco de los brotes y raíz. Es importante aclarar que el efecto promotor sobre el crecimiento fue independiente de los nutrimentos aportados por el medio ya que las semillas se regaron diariamente con una solución nutritiva comercial para prevenir una deficiencia de nutrimentos.

CONCLUSIONES

Al concluir las actividades experimentales se llegó a varias conclusiones:

De acuerdo a los resultados podemos concluir que en las variables de pH de vermicomposta y lixiviados no muestra diferencia significativa con respecto al resto de los tratamientos.

Para los resultados de conductividad eléctrica tanto para vermicomposta y lixiviado se muestra que si existe diferencia estadística significativa en los diferentes tratamientos, concluyendo que para conductividad eléctrica en vermicomposta el tratamiento con heces de Ca es el mejor, y para la de lixiviado el mejor tratamiento es el de Ca+Lom.

El mejor crecimiento de la lombriz *E. foetida* se mostraron en las heces de lombrices de Co +Lom, mientras que en la reproducción donde se encontró el mayor número de huevos fue en el tratamiento de heces de puerco+ lombriz y cabra + lombriz.

Con respecto a la extracción de DNA concluimos que en los tratamientos de lombrices en donde se encontró mayor porcentaje de DNA fueron en las heces de cabra más lombriz, puerco más lombriz y vaca más lombriz estas en los tratamientos de vermicomposta. Mientras que para los experimentos de lixiviados los tratamientos con mejor DNA fue el de heces de vaca más lombriz.

.

BENEFICIO DEL HUMUS DE LOMBRIZ

- ✚ Incrementar la disponibilidad de nitrógeno, fósforo y azufre.
- ✚ Incrementar la eficiencia de la fertilización, en especial nitrógeno.
- ✚ Inactiva residuos de plaguicidas por su capacidad de absorción.
- ✚ Inhibe el crecimiento de hongos y bacterias que afectan a las plantas.
- ✚ Mejora las características químicas del suelo.
- ✚ Mejora la estructura al darle soltura a los suelos pesados y compactos y liga los suelos sueltos y arenosos; por consiguiente, mejora su porosidad.
- ✚ Mejora la permeabilidad y ventilación.
- ✚ Reduce la erosión del suelo.
- ✚ Incrementa la capacidad de retención de humedad.
- ✚ Permite aumentar la capacidad de retención y disponibilidad de nutrientes y agua utilizado por las plantas.
- ✚ Incrementa y diversifica la flora microbiana.

COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y/O APLICADAS

- Conocimientos generales de la carrera: Física, Matemáticas, Biología, Microbiología, Bioquímica, Química Inorgánica, Orgánica, Analítica e Instrumental, etc.
- Habilidades para el trabajo en laboratorio, de manera responsable, bajo normas de seguridad.
- Habilidad para manipular compuestos y reactivos químicos.
- Conocimiento y habilidades en el manejo de equipo e instrumental de laboratorio.
- Habilidades de trabajo en un ambiente laboral, en equipo interdisciplinario y multidisciplinario.
- Reconocimiento y apreciación de la diversidad y multiculturalidad.
- Manifestación del compromiso con los valores y principios éticos.
- Preocupación por el medio ambiente.
- Aplicación de estrategias de aprendizaje cooperativo y colaborativo.
- Capacidad para manejar la crítica y autocrítica de manera constructiva.
- Apertura y capacidad de adaptación a nuevas situaciones.
- Capacidad para identificar, plantear y resolver problemas.
- Capacidad de organización y planificación.
- Actitud proactiva, entusiasmo e interés.
- Capacidad de autoaprendizaje y construcción de conocimiento propio.
- Capacidad para generar nuevas ideas (habilidad creativa).
- Habilidad para trabajar en forma autónoma.
- Habilidades en el manejo de Tecnologías de la Información y la Comunicación (TIC's).
- Manejo de software para procesamiento de datos y elaboración de documentos.
- Comprensión y análisis de textos técnico-científicos en otro idioma (inglés).
- Capacidad para elaborar y desarrollar proyectos de investigación.
- Habilidades de gestión de información: búsqueda, recopilación, selección, clasificación, análisis, síntesis y presentación de información confiable y pertinente proveniente de fuentes diversas.
- Habilidad de aplicar los conocimientos teóricos metodológicos en la práctica.
- Habilidades de comunicación oral y escrita.
- Habilidades del pensamiento: observación, interpretación, abstracción, comprensión, sistematización, deducción y formulación de conclusiones.

REFERENCIAS

- Aghababaei, F., Fayez Raiesi, Hosseinpur, A., 2014. The combined effects of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi on microbial biomass and enzyme activities in a calcareous soil spiked with cadmium. *Applied Soil Ecology* 75, 33–42.
- Aira, M., Sampedro, L., Monroy, F., Domínguez, F., 2008. Detritivorous earthworms directly modify the structure, thus altering the functioning of a microdecomposer food web. *Soil Biology & Biochemistry* 40, 2511–2516.
- Aira, M., Domínguez, J., 2010. Las lombrices de tierra y los microorganismos: desentrañando la caja negra del vermicompostaje. *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.), Número Especial 2: 385–395.
- Brinza, L., Schofield, P.F., J. Fred W. Mosselmans, Donner, E., Lombi, E., Paterson, D., Hodson, M.E., 2014. Can earthworm-secreted calcium carbonate immobilise Zn in contaminated soils?. *Soil Biology & Biochemistry* 74, 1–10.
- Charné van Coller-Myburgh, Leon van Rensburg, Maboeta, M., 2014. Utilizing earthworm and microbial assays to assess the ecotoxicity of chromium mine wastes. *Applied Soil Ecology* 83, 258–265.
- Espinoza N., O., Ferreira, C., Bustos O., E., 2013. Effect of Methamidophos on the Morphology and Male Reproductive Parameters of the Earthworm *Eisenia foetida*. *Int. J. Morphol.* 31(3):1097-1103.
- Fernández G., M.J., Nogales, R., Insam, H., Romero, E., Goberna M., 2011. Role of vermicompost chemical composition, microbial functional diversity, and fungal community structure in their microbial respiratory response to three pesticides. *Bioresource Technology* 102, 9638–9645.
- Garg, V.K., Kaushik, P., 2005. Vermistabilization of textile mill sludge spiked with poultry droppings by an epigeic earthworm *Eisenia foetida*. *Bioresource Technology* 96, 1063–1071.
- Garg, V.K., Kaushik, P., Neeraj, D., 2006. Vermiconversion of wastewater sludge from textile mill mixed with anaerobically digested biogas plant slurry employing *Eisenia foetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65, 412–419.
- Gómez B., M., Lazcano, C., Lores, M., Domínguez, J., 2010. Detritivorous earthworms modify microbial community structure and accelerate plant residue decomposition. *Applied Soil Ecology* 44, 237–244.
- Gómez B., M., Aira, M., Lores, M., Domínguez, J., 2011. Changes in microbial community structure and function during vermicomposting of pig slurry. *Bioresource Technology* 102, 4171–4178.

- Gómez B., M., Lores, M., Domínguez, J., 2013. Changes in chemical and microbiological properties of rabbit manure in a continuous-feeding vermicomposting system. *Bioresource Technology* 128, 310–316.
- Gupta, R., Garg, V.K., 2009. Vermiremediation and nutrient recovery of non-recyclable paper waste employing *Eisenia fetida*. *Journal of Hazardous Materials* 162, 430–439.
- Hanc, A., Chadimova, Z., 2014. Nutrient recovery from apple pomace waste by vermicomposting technology. *Bioresource Technology* 168, 240–244.
- Hasegawa, M., Masamichi T. Ito, Kaneko, S., Kiyono, Y., Ikeda, Sh., Shun'ichi Makino. 2013. Radiocesium concentrations in epigeic earthworms at various distances from the Fukushima Nuclear Power Plant 6 months after the 2011 accident. *Journal of Environmental Radioactivity* 126, 8–13.
- Hofman, C.S., Winston, F., 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*. 57:267-272.
- Jian, Y., Jing Liu, Meiyan Xing, Zhibo Lu, Qiong Yan. 2013. Effect of earthworms on the biochemical characterization of biofilms in vermifiltration treatment of excess sludge. *Bioresource Technology* 143, 10–17.
- Jing L., Zhibo Lu, Jian Yang, Meiyan Xing, Fen Yu, Meiting Guo, 2012. Effect of earthworms on the performance and microbial communities of excess sludge treatment process in vermifilter. *Bioresource Technology* 117, 214–221.
- Jing, L., Zhibo Lu, Jie Zhang, Meiyan Xing, Jian Yang, 2013. Phylogenetic characterization of microbial communities in a full-scale vermifilter treating rural domestic sewage. *Ecological Engineering* 61, 100–109.
- Johnston, A.S.A., Hodson, M.E., Thorbek, P., Alvarez, T., Sibly, R.M., 2014. An energy budget agent-based model of earthworm populations and its application to study the effects of pesticides. *Ecological Modelling* 280, 5–17.
- Jusselme, M.D., Poly, F., Miambi, E., Mora, P., Blouin, M., Pando, A., Rouland-Lefèvre, C., 2012. Effect of earthworms on plant *Lantana camara* Pb-uptake and on bacterial communities in root-adhering soil. *Science of the Total Environment* 416, 200–207.
- García-Pérez, J.A., Alarcón-Gutiérrez, E., Perroni, Y., Barois, I., 2014. Earthworm communities and soil properties in shaded coffee plantations with and without application of glyphosate. *Applied Soil Ecology* 83, 230–237.
- Kaschak, E., Knopf, B., Petersen, J.H., Bings, N.H., König, H., 2014. Biotic methylation of mercury by intestinal and sulfate-reducing bacteria and their potential role in

- mercury accumulation in the tissue of the soil-living *Eisenia foetida*. *Soil Biology & Biochemistry* 69, 202–211.
- Kui, H., Fusheng Li, Yongfen Wei, Xuemin Chen, Xiaoyong F., 2013. Changes of bacterial and fungal community compositions during vermicomposting of vegetable wastes by *Eisenia foetida*. *Bioresource Technology* 150, 235–241.
- Kui, H., Fusheng Li, Yongfen Wei, Xiaoyong Fu, Xuemin Chen, 2014. Effects of earthworms on physicochemical properties and microbial profiles during vermicomposting of fresh fruit and vegetable wastes *Bioresource Technology* 170, 45–52.
- Liu Jun Zhang, Changwei Hu, Weili Wang, Funian Ji, Yibin Cui, Mei Li, 2014. Acute toxicity of multi-walled carbon nanotubes, sodium pentachlorophenate, and their complex on earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 103, 29–35.
- Maňáková, B., Kuta, J., Svobodová, M., Hofman, J., 2014. Effects of combined composting and vermicomposting of wasteludge on arsenic fate and bioavailability. *Journal of Hazardous Materials* 280, 544–551.
- Monroy, F., Aira, M., Domínguez, J., 2008. Changes in density of nematodes, protozoa and total coliforms after transit through the gut of four epigeic earthworms (*Oligochaeta*). *Applied Soil Ecology* 39, 127–132.
- Monroy, F., Aira, M., Domínguez, J., 2009. Reduction of total coliform numbers during vermicomposting is caused by short-term direct effects of earthworms on microorganisms and depends on the dose of application of pig slurry. *Science of the Total Environment* 407, 5411–5416.
- Nannoni, F., Rossi, S., Protano, G., 2014. Soil properties and metal accumulation by earthworms in the Siena urban area (Italy). *Applied Soil Ecology* 77, 9–17.
- Olugbenga, J., Owojori, A. J. Reinecke, 2014. Differences in ionic properties of salts affect saline toxicity to the earthworm *Eisenia fetida*. *Applied Soil Ecology* 83, 247–252.
- Pramanik, P., Young, R.C., 2011. Changes in fungal population of fly ash and vinasse mixture during vermicomposting by *Eudrilus eugeniae* and *Eisenia fetida*: Documentation of cellulase isozymes in vermicompost. *Waste Management* 31, 1169–1175.
- Pratibha, G., Korwar, G.R., Venkateswarlu, B., Desai, S., Ravindra Chary G., Srinivasa Rao M., Srinivas, K., Srinivasa Rao K., Srinivasa Rao Ch., Amalraj, L.D., Choudhary, D.K., M. K. Raju B., Srinivas, I., 2013. Utilization of composted bixa shell with different bioinoculants as soil amendment for ashwagandha and bixa growth. *Ecological Engineering* 61, 235–244.

- Prochazkova, P., Šustr, V., Dvořák, J., Roubalova, R., Škanta, F., Pižl, V., Bilej, M., 2013. Correlation between the activity of digestive enzymes and nonself recognition in the gut of *Eisenia andrei* earthworms. *Journal of Invertebrate Pathology* 114, 217–221.
- Rajiv, P., Sivaraj Rajeshwari, R. Hiranmai Yadav, Venckatesh Rajendran, 2013. Vermiremediation: Detoxification of Parthenin toxin from Parthenium weeds. *Journal of Hazardous Materials* 262, 489–495.
- Rajpal, A., Sudipti Arora, Akansha Bhatia, Tarun Kumar, Renu Bhargava, Chopra, A.K., Kazmi, A.A., 2014. Co-treatment of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) and sewage by vermireactor. *Ecological Engineering* 73, 154–161.
- Roubalová, R., Dvořák, J., Procházková, P., Elhottová, D., Rossmann, P., Škanta, F., Bilej, M., 2014. The effect of dibenzo-p-dioxin- and dibenzofuran-contaminated soil on the earthworm *Eisenia andrei*. *Environmental Pollution* 193, 22–28.
- Sambrook, J., Rusell, D.W., 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, eds).
- Sangwan, P., Kaushik, C.P., Garg, V.K., 2008. Feasibility of utilization of horse dung spiked filter cake in vermicomposters using exotic earthworm *Eisenia foetida*. *Bioresource Technology* 99, 2442–2448.
- Schnug, L., Jensen, J., Janeck J. Scott-Fordsmand, Leinaas, H.P., 2014. Toxicity of three biocides to springtails and earthworms in a soil multi-species (SMS) test system. *Soil Biology & Biochemistry* 74, 115–126.
- Seyede Maryam Kharrazi, Habibollah Younesi, Javad Abedini-Torghabeh, 2014. Microbial biodegradation of waste materials for nutrients enrichment and heavy metals removal: An integrated composting-vermicomposting process. *International Biodeterioration & Biodegradation* 92, 41–48.
- Stepić, S., Hackenberger K., B., Velki, M., Lončarić, Ž., Hackenberger K., D., 2013. Effects of individual and binary-combined commercial insecticides endosulfan, temephos, malathion and pirimiphos-methyl on biomarker responses in earthworm *Eisenia andrei*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36, 715–723.
- Thuy T.D., Jusselme D.M., Jean-Christophe Lata, Bo Van Nguyen, Jouquet, P., 2013. The earthworm species *Metaphire posthuma* modulates the effect of organic amendments (compost vs. vermicompost from buffalo manure) on soil microbial properties. A laboratory experiment. *European Journal of Soil Biology* 59, 15–21.
- Ting X., Meiyang Xing, Jian Yang, Baoyi Lv, Ting Duan, Jing Nie, 2014. Tracking the composition and dominant components of the microbial community via

polymerase chain reaction–denaturing gradient gel electrophoresis and fluorescence in situ hybridization during vermicomposition for liquid-state excess sludge stabilization. *Bioresource Technology* 167, 100–107.

Unuofin, F.O., Mnkeni, P.N.S., 2014. Optimization of *Eisenia fetida* stocking density for the bioconversion of rock phosphate enriched cow dung-waste paper mixtures. *Waste Management* 34, 2000–2006.

Valenzuela E., C., Neria G., I., Alcántara H., R.J., Enríquez A., J.A., Estrada A., I., Hernández R., C., Dendooven, L., Marsch, R., 2009. Phylogenetic analysis of the archaeal community in an alkaline-saline soil of the former lake Texcoco (Mexico). *Extremophiles*. 12:247-254.

Vivas, A., Moreno, B., García R., S., Benítez, E., 2009. Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. *Bioresource Technology* 100, 1319–1326.

Wei, Z., Lin Chen, Kou Liu, Lei Chen, Kuangfei Lin, Yongsheng Chen, Zenguang Yan, 2014. Bioaccumulation of decabromodiphenyl ether (BDE209) in earthworms in the presence of lead (Pb). *Chemosphere* 106, 57–64.

Xiuchao, S., Manqiang Liu, Di Wu, Lin Qi, Chenglong Ye, Jiaguo Jiao, Feng Hu, 2014. Heavy metal and nutrient changes during vermicomposting animal manure spiked with mushroom residues. *Waste Management* 34, 1977–1983.

Yan-Fei, L., Mang Lu, Fang Peng, Yun Wan, Min-Hong, L., 2014. Remediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil by using a combination of ryegrass, arbuscular mycorrhizal fungi and earthworms. *Chemosphere* 106, 44–50.

Yan-Li, D., Meng-Meng, H., Meng Xu, Zeng-Guang, Y., You-Ya, Z., Guan-Lin, G., Jing Nie, Lin-Quan, W., Hong Hou, Fa-Sheng, L., 2014. Interactive effects between earthworms and maize plants on the accumulation and toxicity of soil cadmium. *Soil Biology & Biochemistry* 72, 193–202.

Yasir, M., Aslam, Z., Seon Won Kim, Seon-Woo Lee, Che Ok Jeon, Young Ryun Chung, 2009. Bacterial community composition and chitinase gene diversity of vermicompost with antifungal activity. *Bioresource Technology* 100, 4396–4403.

Žaltauskaitė, J., Sodienė, I., 2014. Effects of cadmium and lead on the life-cycle parameters of juvenile earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 103, 9–16.

Zirbes, L., Renard, Q., Dufey, J., Pham Khanh Tu, Hoang Nghia Duyet, Lebailly, P., Francis, F., Haubruge, E., 2011. Valorisation of a water hyacinth in vermicomposting using

an epigeic earthworm *Perionyx excavatus* in Central Vietnam. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 15(1), 85–93.