



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Agronomía
Programa de Magíster en Ciencias Agronómicas

IMPLICANCIAS DE LA ADICIÓN DE BIOCARBONES SOBRE LAS PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DE VERMICOMPOST DE RESIDUOS VITIVINÍCOLAS

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Agronómicas

SILVIA ESTER ANTILEO MELLADO
CHILLÁN-CHILE
2023

Profesor Guía: María Cristina Muñoz Vargas
Dpto. de Suelos y Recursos Naturales
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Suelos y Recursos Naturales de la Facultad Agronomía, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dra. María Cristina Muñoz Vargas
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Ph.D. Juan C. Sánchez-Hernández
Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímica
Universidad de Castilla-La Mancha

Comisión Evaluadora

Dr. Marco Sandoval Estrada
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dra. Marisol Vargas Concha
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

TABLA DE CONTENIDOS

	Pagina
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	iv
RESUMEN	vii
SUMMARY	viii
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
REFERENCIAS	4
CAPÍTULO 2. IMPLICANCIAS DE LA ADICIÓN DE BIOCARBONES SOBRE LAS PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DE VERMICOMPOST DE RESIDUOS VITIVINÍCOLAS.	10
Abstract	11
1. Introducción	12
2. Materiales y métodos	14
3. Resultados y discusión	24
4. Conclusiones	41
5. Referencias	42

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

		Pagina
Figura 1	Índice de germinación de rábano en respuesta a los tratamientos aplicados. (a) Longitud de radícula (cm); (b) índice de germinación (% IG). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba LSD Fisher ($p \leq 0,05$). Barras de error \pm desviación estándar ($n = 4$). T ₀ : B; T ₁ : B+E; T ₂ : B+E+BC ₁ ; T ₃ : B+E+BC ₂ ; T ₄ : B+E+BC ₃ .	19
Figura 2	Respiración específica acumulada ($\mu\text{g C mg C}^{-1} \text{ h}^{-1}$) durante siete días de incubación para cada tratamiento. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba de LSD-Fischer ($p\text{-valor} \leq 0,05$). T ₀ : B; T ₁ : B+E; T ₂ : B+E+BC ₁ ; T ₃ : B+E+BC ₂ ; T ₄ : B+E+BC ₃ .	21
Figura 3	Respuesta global enzimática para vermicompost con biocarbones añadidos mediante la distribución de las puntuaciones T-SQI (a) e IBRv2 (b). T ₂ : B+E+BC ₁ ; T ₃ : B+E+BC ₂ ; T ₄ : B+E+BC ₃ .	25
Figura 4	Relación entre las puntuaciones T-SQI e IBRv2, en respuesta a las actividades enzimáticas de vermicompost con biocarbones añadidos.	26
Figura 5	Matriz de correlación según la prueba de Spearman para índice de germinación (%IG), actividad fosfatasa (Fos. Ac), rendimiento (Rdto	28

VC), actividad deshidrogenasa (Des), actividad esterasa 1-NB (Est 1-NB), actividad catalasa (Cat), actividad esterasa 4-NPB (Est 4-NPB), actividad ureasa (Ure), actividad glucosidasa (Glu), actividad proteasa (Prot), respiración específica acumulada (RM), N total, C total, relación C/N (C/N) y biomasa microbiana (FDA) en respuesta a los tratamientos aplicados. Valores coloreados en tonos azules y rojos indican correlación positiva y negativa respectivamente. Aquellos sin color tienen correlación insignificante.

Figura 6	Análisis de componentes principales (PCA) para índice de germinación (%IG), actividad fosfatasa (Fos. Ac), rendimiento (Rdto VC), actividad deshidrogenasa (Des), actividad esterasa 1-NB (Est 1-NB), actividad catalasa (Cat), actividad esterasa 4-NPB (Est 4-NPB), actividad ureasa (Ure), actividad glucosidasa (Glu), actividad proteasa (Prot), respiración específica acumulada (RM), N total, C total, relación C/N (C/N) y biomasa microbiana (FDA) determinados para enmiendas orgánicas en ausencia y presencia de lombrices y biocarbones. (a) PCA de individuos. (b) PCA de variables.	30
Tabla 1	Caracterización química de los biocarbones y bagazo de uva.	6

Tabla 2	Recuento de lombrices en tiempo final y rendimiento de las enmiendas (g) en respuesta a los tratamientos aplicados.	16
Tabla 3	Caracterización química de los productos en tiempo final de incubación como respuesta a los tratamientos aplicados.	17
Tabla 4	Actividad enzimática de los vermicompost en tiempo final de incubación como respuesta a los tratamientos aplicados.	22
Tabla 5	Actividad enzimática global reflejada mediante las puntuaciones de índices T-SQI, IBRv2 y GMean para vermicompost al tiempo final de incubación.	24

RESUMEN

El bagazo de uva es el principal subproducto de la industria vitivinícola y su inadecuado descarte es causante de problemáticas ambientales que requiere de técnicas mejoradas para la gestión de este residuo. La evaluación de vermicompost, generado del bagazo de uva, complementado con tres biocarbones (BCs) de diferente origen, se realizó con la finalidad de verificar los cambios en sus propiedades bioquímicas y biológica, mediante un experimento en condiciones ambientales controladas. El vermicompostaje se realizó durante 5 meses utilizando como sustrato bagazo de uva con lombrices de la especie *Eisenia fetida* S., en conjunto con BCs de residuos de la industria forestal y ganadera (estiércol de cerdo y cama de aves) aplicados al 2% (p/p); se consideraron tratamientos controles sin lombrices y sin biocarbones. Al final del vermicompostaje se analizaron las diferencias en rendimiento de vermicompost, poblaciones de lombrices adultas, propiedades químicas, índice de germinación (IG), emisiones de CO₂ y actividades enzimáticas evaluadas mediante los índices GMean, T-SQI e IBRv2 de los vermicompost generados. Los resultados señalan que las poblaciones de lombrices adultas no fueron afectadas por ningún tratamiento; sin embargo, los biocarbones producidos a partir de estiércol porcino y cama de aves aumentaron los rendimientos, como también redujeron significativamente la relación C/N de los vermicompost finales. En relación con el índice de germinación (IG), se evidenció un efecto positivo en todos los tratamientos, situándose sobre 100%, dado que las repuestas fueron mejores que el control. La respiración microbiana se redujo en los tratamientos con biocarbones producto de la fase de maduración, exceptuando el proveniente de planteles avícolas por su alto contenido de carbonatos. Los índices enzimáticos reflejaron una reducción de las actividades enzimáticas en los vermicompost con biocarbón, especialmente en el proveniente de estiércol de cerdo. El tratamiento control sin lombrices ni biocarbón dio lugar a las mayores emisiones de CO₂, mientras que el vermicompost sin biocarbón incrementó el IG. Se concluye que los tres biocarbones influyeron positivamente en acelerar la estabilización del vermicompost, siendo destacado el efecto del BC de estiércol de cerdo.

SUMMARY

Grape bagasse is the main by-product of the wine industry and its improper disposal causes environmental problems that require improved techniques for the management of this waste. The evaluation of vermicompost, generated from grape bagasse, supplemented with three biochars (BCs) of different origin, was carried out in order to verify the changes in its biochemical and biological properties, by means of an experiment under controlled environmental conditions. Vermicomposting was carried out during 5 months using grape bagasse as substrate with earthworms of the species *Eisenia fetida* S., together with BCs from forestry and livestock industry residues (pig manure and poultry litter) applied at 2% (w/w); control treatments without earthworms and without biochar were considered. At the end of vermicomposting, differences in vermicompost yield, adult earthworm populations, chemical properties, germination index (GI), CO₂ emissions and enzymatic activities evaluated by GMean, T-SQI and IBRv2 indices of the vermicompost generated were analyzed. The results indicate that adult earthworm populations were not affected by any treatment; however, biochar produced from swine manure and poultry litter increased yields, as well as significantly reduced the C/N ratio of the final vermicompost. In relation to the germination index (GI), there was a positive effect in all treatments, above 100%, since the responses were better than the control. Microbial respiration was reduced in the treatments with biochar from the maturation phase, with the exception of the biochar coming from poultry plants due to its high carbonate content. The enzymatic indexes reflected a reduction of enzymatic activities in the vermicompost with biochar, especially in the one from pig manure. The control treatment without worms and biochar resulted in the highest CO₂ emissions, while vermicompost without biochar increased GI. It is concluded that all three biochars had a positive influence on accelerating vermicompost stabilization, with the effect of the pig manure BC being outstanding.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La agricultura actual enfrenta diversos desafíos, dentro de los cuales se encuentra alcanzar los Objetivos de Desarrollo Sostenible, dado el aumento de la población mundial en los próximos años. Se estima que en 2050 se deberá asegurar la producción de alimentos para 9.000 a 10.000 millones de personas en el mundo, lo que requiere un incremento de su obtención en un 60 a 110% (UN, 2019; FAO, 2019). Con el fin de mitigar las problemáticas previamente mencionadas, se hace necesario optimizar sistemas de agro sustentables, que involucren el ciclaje de recursos, incorporándolos en las técnicas de manejo los convencionales (Vejan et al., 2021). Las enmiendas orgánicas figuran como una forma de revalorizar residuos agrícolas, aportando a generar condiciones benéficas para la microbiota edáfica y una importante fuente de nutrientes que impacte de forma positiva en aspectos químicos, físicos y biológicos del suelo (Medina et al., 2015; Liu et al., 2016; Kang et al., 2022).

La *Vitis vinifera* L. es uno de los cultivos frutales más importantes en el mundo (Hussain et al., 2008). En 2021 se estimó una producción mundial de 260 mill. hL de vino (OIV, 2022); donde, producto de la vinificación se genera orujo de uva, su principal residuo orgánico, que consta de los restos sólidos derivados del prensado y constituye el 25% de la producción de uva para vino (Zabaniotou et al., 2018). Algunas vías para la gestión de este residuo son la obtención de etanol (Dimou et al., 2016), licores (Ahmad et al., 2020) y nutracéuticos (Salehi et al., 2019; AntoniĆ et al., 2020) elaborados a partir de la abundancia en polifenoles encontrados en el orujo (Poveda et al., 2018), con la finalidad de evitar su aplicación inadecuada en suelos agrícolas (Cortés et al., 2020), que provoquen efectos fitotóxicos en cultivos (Domínguez et al., 2017).

Dentro de estas técnicas se destaca el vermicompostaje, un proceso aeróbico impulsado por lombrices epigeas como *Eisenia fetida* S., *E. andrei* S y *Lumbricus rubellus* H. (Sanchez-Hernandez et al., 2020), en condiciones mesófilas, resultando un material abundante en sustancias húmicas y que promueve el desarrollo de microorganismos (Bhat et al., 2018), con una relación C/N en un rango de 20-28, según datos referenciales (Hirzel y Salazar, 2016).

El vermicompostaje consta de dos fases principales: 1) activación enzimática: aquí las lombrices funcionan como los principales impulsores de la colonización microbiana en la materia orgánica fresca, promoviendo cambios en la estructura y funcionalidad de la comunidad microbiana (Gomez-Brandón et al., 2011; Hanc et al., 2019), a este proceso también se le denomina “procesos asociados al intestino” de estos anélidos (Dominguez et al., 2017). Se ha demostrado que mediante el tránsito intestinal las comunidades microbianas prevalentes corresponden a microorganismos específicos, como miembros del género *Acidovorax* (Schramm et al., 2003), promotores de enzimas que catalizan proteínas y del género *Streptomyces* (Edwards y Arancon, 2022), productores de celulasas, donde ambos permiten a las lombrices reabsorber compuestos complejos catalizados que podrían ser desechados al ambiente de no ocurrir estos procesos. Dicha activación enzimática promueve la aceleración de la descomposición y estabilización de la materia orgánica, donde existe inicialmente una mayor emisión de CO₂, y una intensa actividad microbiológica durante los primeros 30-45 días (Cao et al., 2021; Santana et al., 2020). Luego, se da lugar a la segunda fase de maduración o también llamado cast associate proces (CAP) o procesos asociados a las excreciones de las lombrices (Domínguez y Gómez-Brandón, 2012), donde las lombrices abandonan el sitio por falta de materia orgánica fresca fácilmente digestible y se desplazan por más alimento; aunque, indirectamente siguen actuando sobre el vermicompost ya producido, mediante la colonización de microorganismos y enzimas que dejaron in situ (Khatua et al., 2018); quienes continúan el proceso de inmovilización de compuestos orgánicos. Se caracteriza por ser una fase donde la actividad enzimática y microbiana va en decline, con una menor emisión de CO₂, pero con mayor rendimiento, una menor C/N y mayor contenido nutricional (Ferráz-Ramos et al., 2022). Sin embargo, este proceso se encuentra en constante estudio, con la incorporación de aditivos abundantes en C.

El biocarbón proviene de la pirólisis de biomasa (Lehmann et al., 2011) cuyos beneficios dependen del material base utilizado para su elaboración, dosis agregada y la temperatura aplicada durante el proceso de pirólisis (Sizmur et al., 2017; Agegnehu et al., 2017). Dependiendo de la materia prima, el biocarbón puede aumentar la

disponibilidad de nutrientes para las plantas y mejorar las características físicas de los suelos (Wu et al., 2017). De acuerdo con Sanchez-Hernandez et al. (2019a) los espacios porosos de la estructura del biocarbón pueden ser colonizados por microorganismos y retener enzimas extracelulares.

En estudios relativos al suelo, se ha demostrado la relación del biocarbón con exoenzimas (García-Delgado et al., 2018), como también integrando lombrices, logrando un incremento de la actividad enzimática en el biocarbón de 8 veces en comparación con ambientes libres de lombrices (Sanchez-Hernandez, 2018). Dicha acción es potenciada por el mucus secretado por estos organismos, el cual es capaz de aumentar la retención de enzimas en el biocarbón, actuando como un agente reticulante de la activación enzimática con este material (Huang y Xia, 2018; Sanchez-Hernandez et al., 2019b).

El bagazo de uva ha sido estudiado en investigaciones anteriores como una materia prima abundante en materia orgánica y que sometida a vermicompostaje en fresco (Santana et al., 2020) y post destilado (Gómez-Brandón et al., 2023), resulta en un biofertilizante con propiedades remediadoras de pesticidas, enriquecida sobre todo de microorganismos y enzimas extracelulares (Domínguez et al., 2019).

Si bien a la fecha, existen estudios que evalúan los efectos de los biocarbones y vermicompost por separado, existe poca evidencia científica de cómo estos dos factores en conjunto se complementan en el vermicompostaje de orujo de uva.

HIPÓTESIS

El uso de biocarbón en la elaboración de vermicompost permite acelerar la estabilización de los materiales y enriquecer sus propiedades bioquímicas y biológicas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el impacto de biocarbones de distinta naturaleza sobre su estabilización y las propiedades bioquímicas y biológicas de vermicompost de residuos vitivinícolas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto del vermicompostaje en presencia de biocarbón sobre las poblaciones de lombrices *E. fetida* y el rendimiento de los productos finales.
- Analizar las propiedades bioquímicas del vermicompost generado con biocarbones.
- Determinar el efecto de los tratamientos sobre propiedades biológicas de los vermicompost finales.

REFERENCIAS

- Agegehu, G., Srivastava, A.K., Bir, M.I. 2017. The role of biochar and biochar-compost in improving soil quality and crop performance: A review. *Applied Soil Ecology*. 119, 156-170.
- Ahmad, B., Yadav, V., Yadav, A., Rahman, M.U., Yuan, W.Z., Li, Z., Wang, X. 2020. Integrated biorefinery approach to valorize winery waste: A review from waste to energy perspectives. *Science of the Total Environment*. 719, 137315.
- Antonić, B., Jančíková, S., Dordević, D., Tremlová, B. 2020. Grape Pomace Valorization: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Foods*. 9(11), 1627.
- Bhat, S.A., Singh, J., Vig, A.P. 2018. Earthworms as organic waste managers and biofertilizer producers. *Waste and Biomass Valorization*. 9 (7), 1073-1086.
- Cao, Y., Tian, Y., Wu, Q., Li, J., Zhu, H. 2021. Vermicomposting of livestock manure as affected by carbon-rich additives (straw, biochar and nanocarbon): A comprehensive evaluation of earthworm performance, microbial activities, metabolic functions and vermicompost quality. *Bioresource Technology*. 320, 124404.

- Cortés, A., Moreira, M.T., Domínguez, J., Lores, M., Feijoo, G. 2020. Unraveling the environmental impacts of bioactive compounds and organic amendment from grape marc. *Journal of Environmental Management*. 272, 111066.
- Dimou, C., Vlysidis, A., Kopsahelis, N., Papanikolaou, S., Koutinas, A.A., Kookos, I.K. 2016. Techno-economic evaluation of wine lees refining for the production of value-added products. *Biochemical Engineering Journal*, 116, 157–165.
- Domínguez, J., Sanchez-Hernandez, J.C., Lores, M. 2017. Vermicomposting of wine-making products. pp, 55–78. In: Galanakis CM (Ed). *Handbook of grape processing by-products: sustainable solutions*. Academic Press, Elsevier. London, UK.
- Domínguez, J., Gómez-Brandón, M. 2012. Vermicomposting: composting with earthworms to recycle organic wastes. pp. 29–48. In: Kumar, S., Bharti, A. (Eds.), *Management of Organic Waste*. Intech Open Science, Rijeka, Croacia.
- Edwards, C.A., Arancon, N.Q. 2022. Interactions Between Earthworms, Microorganisms, and Other Invertebrates. In: *Biology and Ecology of Earthworms*. Springer, New York, NY.
- Ferraz-Ramos, R., Santana, N., de Andrade, N., Scheffer Romagna, I., Tirloni, B., de Oliveira Silveira, A., Domínguez, J., Josemar Seminoti Jacques, R. 2022. Vermicomposting of cow manure: Effect of time on earthworm biomass and chemical, physical, and biological properties of vermicompost. *Bioresource Technology*, 345, 126572.
- FAO. 2019. Strengthened global partnerships needed to end hunger and malnutrition.
- García-Delgado, C., Eymar, E., Camacho-Arévalo, R., Petruccioli, M., Crognale, S., D'Annibale, A. 2018. Degradation of tetracyclines and sulfonamides by stevensite-and biochar-immobilized laccase systems and impact on residual

antibiotic activity. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 93(12), 3394-3409.

Gómez-Brandón, M., Lazcano, C., Lores, M., Domínguez, J. 2011. Short-term stabilization of grape marc through earthworms. *Journal of Hazardous Materials*, 187(1-3), 291–295.

Gómez-Brandón, M., Lores, M., Domínguez, J. 2023. Recycling and valorization of distilled grape marc through vermicomposting: a pilot-scale study. *Journal of Material Cycles and Waste Management*. 25 (3), 1509-1518

Hanc, A., Hrebeckova, T., Kuzel, S. 2019. Vermicomposting of Distillery Residues in a Vertical-Flow Windrow System. *Waste and Biomass Valorization*, 10(12), 3647–3657.

Hirzel, J., Salazar F. 2016. Guía de manejo y buenas prácticas de aplicación de enmiendas orgánicas en agricultura. Boletín INIA. N°325. 56 p. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Chillán, Chile.

Huang, K., Xia, H. 2018. Role of earthworms' mucus in vermicomposting system: biodegradation tests based on humification and microbial activity. *Science of the Total Environment*. 610, 703-708.

Hussain, M., Cholette, S., Castaldi, R.M. 2008. An analysis of globalization forces in the wine industry: implications and recommendations for wineries. *Journal of Global Marketing*. 21 (1), 33-47.

Kang, Y.G., Lee, J.H., Chun, J.H., Yun, Y.U., Atef Hatamleh, A., Al-Dosary, M.A., Al-Wasel, Y.A., Lee, K.S., Oh, T.K. 2022. Influence of individual and co-application of organic and inorganic fertilizer on NH₃ volatilization and soil quality. *Journal of King Saud University - Science*, 34(5), 102068.

- Khatua, C., Sengupta, S., Krishna Balla, V., Kundu, B., Chakraborti, A., Tripathi, S. 2018. Dynamics of organic matter decomposition during vermicomposting of banana stem waste using *Eisenia fetida*. *Waste Management*, 79, 287–295.
- Lehmann, J., Rillig, M.C., Thies, J., Masiello, C.A., Hockaday, W.C., Crowley, D. 2011. Biochar effects on soil biota – A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(9), 1812–1836.
- Liu, T., Chen, X., Hu, F., Ran, W., Shen, Q., Li, H., Whalen, J. K. 2016. Carbon-rich organic fertilizers to increase soil biodiversity: Evidence from a meta-analysis of nematode communities. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 232, 199–207.
- Medina, J., Monreal, C., Barea, J.M., Arriagada, C., Borie, F., Cornejo, P. 2015. Crop residue stabilization and application to agricultural and degraded soils: A review. *Waste Management*, 42, 41–54.
- OIV. 2022. Actualidad de la coyuntura del sector vitivinícola mundial en 2021. [en línea]. <<https://www.oiv.int/public/medias/8780/es-state-of-the-world-vine-and-wine-sector-abril-2022.pdf>>. [Consulta: 20 marzo 2023].
- Poveda, J.M., Loarce, L., Alarcón, M., Díaz-Maroto, M.C., Alañón, M.E. 2018. Revalorization of winery by-products as source of natural preservatives obtained by means of green extraction techniques. *Industrial Crops and Products*, 112, 617–625.
- Salehi, B., Vlasisavljevic, S., Adetunji, C.O., Adetunji, J.B., Kregiel, D., Antolak, H., Pawlikowska, E., Uprety, Y., Mileski, K.S., Devkota, H.P., Sharifi-Rad, J., Das, G., Patra, J.K., Jugran, A.K., Segura-Carretero, A., Contreras, M. del M. 2019. Plants of the genus *Vitis*: Phenolic compounds, anticancer properties and clinical relevance. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 362–379.

- Sanchez-Hernandez, J.C. 2018. Biochar activation with exoenzymes induced by earthworms: A novel functional strategy for soil quality promotion. *Journal of Hazardous Materials*. 350: 136-143.
- Sanchez-Hernandez, J.C., Andrade Cares, X., Pérez, M.A., Notario del Pino, J. 2019a. Biochar increases pesticide-detoxifying carboxylesterases along earthworm burrows. *Science of the Total Environment*. 667, 761-768.
- Sanchez-Hernandez, J.C., Ro, K.S., Díaz, F.J. 2019b. Biochar and earthworms working in tandem: Research opportunities for soil bioremediation. *Science of the Total Environment*. 688, 574-583.
- Sanchez-Hernandez, J.C., Capowicz, Y., Ro, K.S. 2020. Potential Use of Earthworms to Enhance Decaying of Biodegradable Plastics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 8(11), 4292–4316.
- Santana, N.A., Jacques, R.J.S., Antonioli, Z.I., Martínez-Cordeiro, H., Domínguez, J. 2020. Changes in the chemical and biological characteristics of grape marc vermicompost during a two-year production period. *Applied Soil Ecology*, 154, 103587.
- Schramm, A., Davidson, S.K., Dodsworth, J.A., Drake, H.L., Stahl, D.A., Dubilier, N., 2003. Acidovorax-like symbionts in the nephridia of earthworms. *Environ. Microbiol.* 5, 804–809.
- Sizmur, T., Fresno, T., Akgül, G., Frost, H., Moreno-Jiménez, E. 2017. Biochar modification to enhance sorption of inorganics from water. *Bioresource Technology*. 246: 34-47.
- United Nations. 2019. DESA population division world: Total division (perspectivas de la población mundial. extraído de <https://population.un.org/wpp/Graphs/DemographicProfiles/Line/900>.

Vejan, P., Khadiran, T., Abdullah, R., Ahmad, N. 2021. Controlled release fertilizer: A review on developments, applications and potential in agriculture. *Journal of Controlled Release*. 339, 321–334.

Wu, S., Huijun, H., Inyhapanya, X., Yang, C., Lu, L., Zeng, G., Han, Z. 2017. Role of biochar on composting of organic wastes and remediation of contaminated soils - a review. *Environmental Science and Pollution Research*. 24, 16560-16577.

Zabaniotou, A., Kamaterou, P., Pavlou, A., Panayiotou, C. 2018. Sustainable bioeconomy transitions: Targeting value capture by integrating pyrolysis in a winery waste biorefinery. *Journal of Cleaner Production*, 172, 3387–3397.

CAPÍTULO 2. IMPLICANCIAS DE LA ADICIÓN DE BIOCARBONES SOBRE LAS PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DE VERMICOMPOST DE RESIDUOS VITIVINÍCOLAS

Silvia Antileo-Mellado¹, Juan C. Sánchez-Hernández², Cristina Muñoz³ *, and Marco Sandoval³

¹Master in Agronomic Sciences, Faculty of Agronomy, Universidad de Concepción, Chillán 3780000, Chile; santileo2016@udec.cl (S.A.-M.).

²Laboratory of Ecotoxicology, Faculty of Environmental Science and Biochemistry, University of Castilla-La Mancha, Toledo, Spain (JC. S.-H).

³Department of Soils and Natural Resources, Faculty of Agronomy, Universidad de Concepción, Chillán 3812120, Chile; masandov@udec.cl (M.S).

***Correspondence:** cristinamunoz@udec.cl (C.M.).

Keywords: Vermicompost; Earthworms; Grape bagasse; Biochar; Enzymatic index.

Journal: Chilean Journal of Agriculture Research

Fecha de envío: 24-05-2023 **Publicado:** _____

Abstract

Agricultural and industrial wastes require proper management to avoid negative environmental implications. Our objective was to evaluate the biochemical and biological properties of vermicompost co-production from wastes. Different wastes were considered in this study such as grape bagasse from the wine industry, swine manure and poultry litter from animal production and pine sawdust from the forestry industry. Grape bagasse was the substrate for vermicomposting and the other organic wastes were converted into biochar (BC). Vermicomposting was co-produced for 5 months using *Eisenia fetida* S. earthworms together with BCs (eucalyptus sawdust biochar, BC₁; pig manure biochar, BC₂; and carbonaceous poultry litter material, BC₃) at 2% (w/w). Chemical, microbiological and enzymatic determinations were performed. After the incubation period, adult earthworm populations were not affected by any treatment and no toxic effects on radish plants were detected. Microbial respiration and enzymatic activities were reduced with the incorporation of BCs, while a stabilized vermicompost free of phytotoxic compounds was obtained. Although all three BCs positively influenced the process, it was the porcine BC that optimized the stabilization of organic matter.

Keywords: Vermicompost; Earthworms; Grape bagasse; Biochar; Enzymatic index.

1. Introducción

El desaprovechamiento de residuos orgánicos es una problemática social, económica y ambiental (Sharma y Garg, 2018). A nivel mundial se desperdician cerca de 1.300 mill. tons de materias primas cada año, equivalente a un tercio de la producción mundial destinada para el consumo humano (FAO, 2011); siendo la agricultura una importante actividad generadora de desechos (FAO, 2019), que correctamente gestionados son una fuente abundante de nutrientes y materia orgánica (Huang et al., 2021).

La *Vitis vinifera* L. es uno de los cultivos frutales más importantes en el mundo (Hussain et al., 2008). En 2021 se estimó una producción mundial de 260 mill. hL de vino (OIV, 2022); donde, producto de la vinificación se genera orujo de uva, su principal residuo orgánico, que consta de los restos sólidos derivados del prensado y constituye el 25% de la producción de uva para vino (Zabaniotou et al., 2018). Algunas vías para la gestión de este residuo son la obtención de etanol (Dimou et al., 2016), licores (Ahmad et al., 2020) y nutracéuticos (Salehi et al., 2019; Antonić et al., 2020) elaborados a partir de la abundancia en polifenoles encontrados en el orujo (Poveda et al., 2018), con la finalidad de evitar su aplicación inadecuada en suelos agrícolas (Cortés et al., 2020), que provoquen efectos fitotóxicos en cultivos (Domínguez et al., 2017).

Dentro de estas técnicas se destaca el vermicompostaje, un proceso aeróbico impulsado por lombrices epigeas como *Eisenia fetida* S., *E. andrei* S. y *Lumbricus rubellus* H. (Sanchez-Hernandez et al., 2020), en condiciones mesófilas, resultando un material abundante sustancias húmicas y que promueve el desarrollo de microorganismos (Bhat et al., 2018), con una relación C/N en un rango de 20-28, según datos referenciales (Hirzel y Salazar, 2016).

El vermicompostaje consta de dos fases principales: 1) activación enzimática: aquí las lombrices funcionan como los principales impulsores de la colonización microbiana en la materia orgánica fresca, promoviendo cambios en la estructura y funcionalidad de la comunidad microbiana (Gomez-Brandón et al., 2011; Hanc et al., 2019), a este proceso también se le denomina procesos asociados al intestino de estos anélidos (Domínguez et al., 2017). Se ha demostrado que mediante el tránsito intestinal las

comunidades microbianas prevalentes corresponden a microorganismos específicos, como miembros del género *Acidovorax* (Schramm et al., 2003), promotores de enzimas que catalizan proteínas y del género *Streptomyces* (Edwards y Arancon, 2022), productores de celulasas, donde ambos permiten a las lombrices reabsorber compuestos complejos catalizados que podrían ser desechados al ambiente de no ocurrir estos procesos. Dicha activación enzimática promueve la aceleración de la descomposición y estabilización de la materia orgánica, donde existe inicialmente una mayor emisión de CO₂, y una intensa actividad microbiológica durante los primeros 30-45 días (Cao et al., 2021; Santana et al., 2020). Luego, da lugar a la segunda fase de maduración o también llamado procesos asociados a las excreciones de las lombrices (Domínguez y Gómez-Brandón, 2012), donde las lombrices abandonan el sitio donde no encuentran materia orgánica fresca fácilmente digestible y se desplazan por más alimento; aunque, indirectamente siguen actuando sobre el vermicompost ya producido, mediante la colonización de microorganismos y enzimas que dejaron in situ (Khatua et al., 2018); quienes continúan el proceso de inmovilización de compuestos orgánicos. Se caracteriza por ser una fase donde la actividad enzimática y microbiana va en decline, con una menor emisión de CO₂, pero con mayor rendimiento, una menor C/N y mayor contenido nutricional (Ferráz-Ramos et al., 2022). Sin embargo, este proceso se encuentra en constante estudio, con la incorporación de aditivos abundantes en C.

El biocarbón proviene de la pirólisis de biomasa (Lehmann et al., 2011) cuyos beneficios dependen del material base utilizado para su elaboración, dosis agregada y la temperatura aplicada durante el proceso de pirólisis (Sizmur et al., 2017; Agegnehu et al., 2017). Dependiendo de la materia prima, el biocarbón puede aumentar la disponibilidad de nutrientes para las plantas y mejorar las características físicas de los suelos (Wu et al., 2017). De acuerdo con Sánchez-Hernández et al. (2019a) los espacios porosos de la estructura del biocarbón pueden ser colonizados por microorganismos y retener enzimas extracelulares.

Existe evidencia de la interacción entre el biocarbón y exoenzimas en ambientes como el suelo (García-Delgado et al., 2018), así como en presencia de lombrices,

detectándose un incremento de la actividad enzimática en el biocarbón de 8 veces en comparación con ambientes libres de lombrices (Sanchez-Hernandez, 2018). Dicha acción es potenciada por el mucus secretado por estos organismos, el cual es capaz de aumentar la retención de enzimas en el biocarbón, actuando como un agente reticulante de la activación enzimática con este material (Huang y Xia, 2018; Sanchez-Hernandez et al., 2019b).

El orujo ha sido estudiado en investigaciones anteriores como una materia prima abundante en materia orgánica y que sometida a vermicompostaje en fresco (Santana et al., 2020) y post destilado (Gómez-Brandón et al., 2023), resulta en un biofertilizante con propiedades remediadoras de pesticidas, enriquecida sobre todo de microorganismos y enzimas extracelulares (Domínguez et al., 2017).

Si bien a la fecha, existen estudios que evalúan los efectos de los biocarbones y vermicompost, no existe claridad con relación a la respuesta en su conjunto sobre las cualidades del producto final. Por lo que el objetivo de este estudio es evaluar el efecto de la producción de vermicompost con biocarbón sobre sus propiedades bioquímicas y biológicas.

2. Materiales y métodos

2.1. Obtención de biocarbones y material carbonoso

Las materias primas correspondieron a desechos de plántales ganaderos avícolas y porcinos, además de residuos de madera, obtenidos de productores del Centro-Sur de Chile. Los residuos ganaderos y lignocelulósicos se homogeneizaron y tamizaron a través de un tamiz de 5 mm previo secado a temperatura ambiente por 2 semanas (Ginebra et al., 2022).

Los biocarbones se obtuvieron mediante pirólisis lenta, con temperatura máxima de 550 °C durante 2 horas en un horno de fabricación local. Los gases emanados en el proceso se condensaron y recuperaron en porción líquida, no son considerados en este estudio (Muñoz et al., 2019).

Se obtuvieron dos biocarbones y un material carbonoso: biocarbón de residuos de madera de eucalipto (BC₁), biocarbón de estiércol de cerdo (BC₂) y material carbonoso

de cama de aves de corral (BC₃). Este último consta de un bajo contenido de carbono orgánico (CO = 5,64 %; Ginebra et al., 2022), por lo que no califica como biocarbón según el Certificado Europeo de Biocarbón y las directrices del IBI, considerándose un material carbonoso, para el entendimiento de este estudio también se le denomina biocarbón. Los biocarbones se homogeneizaron, tamizaron (<250 µm) y almacenaron en desecadores hasta su uso. Sus características se analizaron en estudios previos (Tabla 1: Ginebra et al., 2022).

2.2. Establecimiento del ensayo

El estudio se realizó en la región de Ñuble, Chile (36°54'35.8"S 72°24'40.5"W) bajo condiciones ambientales controladas, utilizando bagazo de uva variedad País (*Vitis vinífera L.*) obtenida de viñedos en el Valle del Itata. Este material fue compostado por 7 semanas previo al inicio de los ensayos, con la finalidad de evitar el exceso de compuestos polifenólicos fitotóxicos (Domínguez et al., 2014). Se utilizaron recipientes plásticos de 6 L de capacidad perforados en la base para evitar la acumulación de lixiviados; en su interior se adicionaron 2 kg de bagazo en mezcla con cada uno de los biocarbones y material carbonoso obtenidos, en una proporción al 2% (p/p) del sustrato (El-Naggar et al., 2019) y se agregaron 100 lombrices de la especie *Eisenia fetida S.*, las cuales fueron seleccionadas en ejemplares adultas y juveniles por partes iguales (Sanchez-Hernandez et al., 2020).

Tabla 1. Caracterización química de los biocarbones y bagazo de uva.

Parámetro	Unidades	BC ₁	BC ₂	BC ₃	B
pH	–	5.73	8.2	10.24	6.78
CE (1:5)	dS m ⁻¹	–	–	–	2.14
MO	%	–	–	–	95.45
TN	g kg ⁻¹	2.8	33.9	8.4	18.4
TC	g kg ⁻¹	841.5	418.8	116.1	553.7
C:N	–	300.5	12.4	13.8	30.09
N-NO ₃	mg kg ⁻¹	380	7860	9400	25.5
N-NH ₄ ⁺	mg kg ⁻¹	0.55	9.58	5.79	79.8
K disp.	g kg ⁻¹	0.32	16.15	14.78	11.29
P disp.	g kg ⁻²	1.58	13.17	22.19	2.71
Mg disp.	g kg ⁻³	0.06	12.85	12.32	1.09
Ca disp.	g kg ⁻⁴	0.71	30.57	223.8	4.93

CaCO₃-eq	%	0.39	2.45	12.69	-
S	mg kg ⁻¹	<d.l	260	230	-
Fe	mg kg ⁻¹	-	-	-	295
Mn	mg kg ⁻¹	-	-	-	17
Zn	mg kg ⁻¹	-	-	-	7
Cu	mg kg ⁻¹	-	-	-	16
B	mg kg ⁻¹	-	-	-	20
Humedad BH	%	-	-	-	42.4

BC₁: residuo de madera de eucalipto; BC₂: estiércol de cerdo; BC₃: residuos de cama de aves de corral y B: bagazo de uva. Fuente: Ginebra et al., (2022). <d.l. = bajo límite de detección

2.3. *Tratamientos*

Se establecieron cinco tratamientos en un diseño completamente al azar con cuatro réplicas por cada uno, correspondientes a: T₀: B (control); T₁: B+E (estándar); T₂: B+E+BC₁; T₃: B+E+BC₂; T₄: B+E+BC₃, donde B: bagazo, E: lombrices y BC correspondiendo a cada tipo de biocarbón (Tabla 1). Los contenedores fueron incubados entre 7°C y 26°C, rango de temperatura adecuada para el desarrollo del vermicompostaje (Garg y Gupta, 2011) durante 5 meses en condiciones de oscuridad hasta el término del ensayo.

Cumplido el tiempo de incubación se tamizó el contenido de cada recipiente por un tamiz de 2 mm para la obtención de los productos estabilizados. Fue descartado el material que superó este tamaño de partícula. El material superior al tamaño de partícula se descartó previo conteo de lombrices adultas y juveniles, siendo consideradas en el conteo lombrices las que presenten color marrón. El material se almacenó a 4 °C hasta análisis.

2.4 *Análisis químicos*

Los contenidos de C y N totales se determinaron mediante combustión seca en analizador elemental (Truspec CN, LECO, St. Joseph, MI, EE. UU.). El pH, materia orgánica y los contenidos de N-NO₃, N-NH₄⁺, P, K disponibles, Ca, Mg y de micronutrientes como B, Cu y Mn se obtuvieron a través de muestras compuestas para

cada tratamiento y los procedimientos se realizaron según los protocolos estándar para compost (Sadzawka *et al.*, 2005).

2.5. Índice de germinación sobre semillas de rábano

Se mezclaron 5 g de cada producto con 50 mL de agua destilada (1:10 p/v). El contenido se agitó a 180 rpm durante 20 min, luego se obtuvieron 4 mL del extracto y se dispusieron en cápsulas Petri con papel filtro (Celis *et al.*, 2008). Se añadieron 10 semillas de rábano espaciadas. Las cápsulas Petri se ubicaron en una cámara de germinación durante 120 h a 20 ± 2 °C y humedad constante del 100%. Adicionalmente, se incorporaron cápsulas con agua destilada como control absoluto de la semilla. El índice de germinación se determinó según Tiquia y Tam (1998), lo que permite evaluar la toxicidad baja o menor que afecta el crecimiento de las raíces, así como la toxicidad alta o mayor (Nafez *et al.*, 2015; Unuofin *et al.*, 2016), para determinar el efecto en la germinación de semillas de rábano, expresado en la ecuación 1:

[Ec. 1]

$$IG = (G \times L / Gc \times Lc) \times 100$$

Donde IG es el índice de germinación (%), G es la media de semillas germinadas en la muestra, Gc es la media de semillas germinadas en el control absoluto, L es la media de longitud de radícula en la muestra (cm) y Lc es la media de longitud de radícula en el control absoluto (cm). El valor de IG puede variar de 0 a más del 100%.

Posteriormente, se observó si las plántulas presentaron signos de fitotoxicidad, como necrosis en ápices de las radículas o deficiente desarrollo de pelos absorbentes. Se registró el número de semillas germinadas donde el criterio de germinación se determinó como un mínimo de 5 mm de longitud de las radículas visibles, medidos con calibre Vernier.

2.6. Preparación de muestras para ensayos enzimáticos

Las actividades enzimáticas se midieron en extractos de vermicompost-agua 1:50 (p/v) según Sanchez-Hernandez *et al.* (2015). Se dispersó un gramo de material húmedo en 50 mL de agua destilada durante 30 min a temperatura ambiente (~ 20 °C) en tubos Falcon™ y utilizando un agitador orbital (Elmi® Intelli-mixer RM-2L, programa C2, 50

rpm). Los ensayos de fosfatasa ácida, β -glucosidasa, ureasa y proteasa demandaban mayores tiempos de reacción (4 h), por lo que se añadió azida de sodio (NaN_3 ; 1 mM, concentración final) a las suspensiones para anular crecimiento microbiano (Turner, 2010). NaN_3 se incorporó posteriormente a las determinaciones de carboxilesterasa (CbE) con el fin de evitar su interferencia en la formación del complejo Fast Red-naphthol.

2.7. Actividad enzimática

Se escogió un grupo de enzimas extracelulares relacionadas a los ciclos del carbono (carboxilesterasa y β -glucosidasa), nitrógeno (proteasa y ureasa) y fósforo (fosfatasa ácida). Además, se determinaron las actividades de deshidrogenasa y catalasa como indicadores generales de la actividad microbiana de los suelos (von Mersi y Schinner, 1991, Trasar-Cepeda et al., 1999).

Se determinó la actividad deshidrogenasa (von Mersi y Schinner, 1991), utilizando cloruro de yodonitrotetrazolio como aceptor de electrones. La formación de formazán de yodonitrotetrazolio reducido (INTF); se determinó de manera espectrofotométrica posterior a una reacción de 60 min a 40 °C, y los resultados se expresaron como $\mu\text{mol INTF h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de vermicompost (VC) seco.

Para la actividad de catalasa (Trasar-Cepeda et al. 1999) se realizaron suspensiones de VC:agua en mezclador rotatorio combinando 0,5 g de material húmedo y 8 mL de agua destilada durante 30 min. La reacción fue iniciada añadiendo 1 mL de H_2O_2 al 0,3% (p/v) incubándose los tubos durante 15 min a temperatura ambiente (~ 20 °C). Se detuvo la reacción añadiendo 1 mL de H_2SO_4 3 M. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 4500 \times g durante 10 min a 10 °C. El producto se leyó a 505 nm y la actividad de la catalasa se expresó como $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2$ consumidos $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de VC seco usando una curva de calibración elaborada con H_2O_2 .

La actividad carboxilesterasa se determinó según Sanchez-Hernandez et al. (2015) mediante dos sustratos diferentes: 1-butirato de naftilo (1-NB) y 4-butirato de nitrofenilo (4-NPB). Se incorporaron dos ésteres carboxílicos diferentes debido a la aparición de múltiples isoformas enzimáticas con una marcada sensibilidad específica del sustrato

a contaminantes presentes en los suelos como los organofosforados (Sanchez-Hernandez et al., 2015). La mezcla de reacción consistió en 140 μL de Tris-HCl 0,1M (pH=6,5), 100 μL de suspensión vermicompost-agua y 10 μL de sustrato. La incubación se realizó a través de agitación durante 1h a 20 °C con agitador orbital termostáticamente controlado Elmi ®Skyline DTS-2, 800 rpm. Las microplacas se centrifugaron (2500 rpm, 10 °C y 10 min) y se trasladaron 150 μL de sobrenadantes a nuevas microplacas. La absorbancia del producto de la hidrólisis del éster de naftilo (1-naftol) se leyó a 530 nm.

Para la hidrólisis de 4-NPB, la formación de 4-nitrofenol se determinó posterior a la adición de 75 μl de una solución que contenía 2 % (p/v) de SDS y 2 % (p/v) de base Tris a microplaca que contenía 150 μl de sobrenadantes, se leyó inmediatamente la absorbancia a 405 nm. Las actividades enzimáticas se expresaron en μmol de producto por hora y gramo de material seco, utilizando curvas de calibración hechas con 1-naftol (1,5–100 nmol mL^{-1}) y 4-nitrofenol (5–100 nmol mL^{-1}). Las curvas de calibración se efectuaron en presencia de suspensiones VC - agua. Se consideraron controles (sin sustrato) y blancos (sin VC) para corregir la absorbancia de fondo e hidrólisis no enzimática de los sustratos, respectivamente.

Las actividades de fosfatasa ácida y β -glucosidasa se determinaron según Popova y Deng (2010) en una mezcla de reacción que contuvo 100 μl de suspensión VC:agua, 100 μl de agua destilada y 50 μl de sustratos respectivos (4-nitrofenil fosfato o 4-nitrofenil β - d - glucanopiranosido) previa disolución en tampón universal modificado 20 mM (pH = 6,5). Se realizó agitación continua a 20 °C durante de 4 h, para posteriormente centrifugar las microplacas (2500 x g, 10 °C y 10 min) y se transfirieron alícuotas de 150 μl de sobrenadante a nuevas microplacas. El 4-nitrofenol formado fue leído a 405 nm previa adición de 75 μl de NaOH 0,5 M a las celdas. Las curvas de calibración estándar se realizaron con 4-nitrofenol (5–100 nmol mL^{-1}).

La actividad de la proteasa se midió según Schinner et al. (1996). Sin embargo, las reacciones se realizaron utilizando tubos de microcentrífuga de 1,5 mL para reducir el consumo de reactivos. La mezcla de reacción constó de 0,5 mL de suspensión VC-agua y 0,5 mL de caseína al 2% p/v disuelta en Tris-HCl 50 mM (pH = 8,1). El exceso

de proteínas precipitó mediante adición de ácido tricloroacético frío 0,92 M seguido de centrifugación ($10\,000 \times g$, 20 min, 4 °C), posterior al proceso de agitación continua en un baño de agua a 50 °C durante 4 h. Se añadieron alícuotas (80 μ l) de sobrenadantes a los pocillos de la microplaca y los aminoácidos aromáticos formados se detectaron mediante la adición de 120 μ l de una solución alcalina (50:1:1, v/v, 0,47M Na_2CO_3 que contiene 6 mM NaOH: 20 mM CuSO_4 : 26mM tartrato de sodio y potasio) seguido de 80 μ l de solución al 10 % (v/v) reactivo fenol de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich ®, Madrid). Las microplacas se mantuvieron en oscuridad durante 90 min y el complejo azul se leyó a 700 nm. Se empleó tirosina (Sigma-Aldrich ®, Madrid) como patrón y la actividad de la proteasa se expresó en μmol de equivalentes de tirosina (tyr) $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de VC seco.

La actividad ureasa se determinó según método sin tampón de Schinner et al. (1996). Las reacciones hidrolíticas se realizaron en tubos de 10 mL mezclando 1 mL de urea 80 mM y 1 mL de suspensión VC:agua. Se les aplicó agitación orbital durante 4 h a temperatura ambiente (~ 20 °C). Se terminaron las reacciones añadiendo 5 mL de 2M KCl frío que contenía 10 mM HCl. Los tubos se sometieron a centrifuga ($4500 \times g$, 5 min, 10 °C) previa agitación durante 30 min con la finalidad de extraer el amonio. Se vertieron sobrenadantes (150 μ l) en los celdas de las microplacas y se midió el amonio luego de agregar 75 μ l de 1:1 (v:v) 0,3 M NaOH: 1,06 M salicilato de sodio que contiene 4,6 mM nitroprusiato de sodio, seguido de la adición de 30 μ l de 39,1 mM dicloroisocianuro de sodio. Las microplacas se sometieron a oscuridad durante 30 min y se leyó la absorbancia a 690 nm. La actividad de la ureasa se expresó como μg NH_4^+ -N $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de VC seco utilizando una curva de calibración realizada con NH_4Cl (3,0–50 μg NH_4^+ mL^{-1}).

2.8. Actividad microbiana

La determinación de actividad microbiana se realizó mediante hidrólisis de fluoresceína diacetato (FDA), obteniéndose la producción de fluorescencia en hidrolizados de FDA (Alef y Nannipieri, 1995). Indica la cuantificación de la actividad microbológica activa total que existe en un sustrato evaluado. Es un método colorimétrico en donde ésteres

de fluoresceína son transportados a través de las membranas de células vivas, por lo que este método arroja un valor relativo solamente a microbiota activa (Prosser et al., 2011). La absorbancia se determinó utilizando un espectrofotómetro UV/VIS (Thermo Spectronic modelo Genesys TM 5, Vernon Hills, IL, EE. UU.) a 490 nm.

2.9. Respiración microbiana

Se analizó mediante la determinación de la respiración específica acumulada con mediciones de dióxido de carbono (CO₂). Estas se obtuvieron por espectroscopía infrarroja mediante un analizador de gases de CO₂ (Li-820, LI-COR Bioscience, Shelton, CT, EE. UU.) mediante incubaciones de los sustratos, determinándose las emisiones de CO₂ a intervalos de 3, 5 y 7 días. Las incubaciones de los distintos tratamientos se realizaron a 22 °C (Cheng et al., 2006). Se añadieron 15 g de cada muestra en tubos Falcon de 50 mL con tapones septados de goma para el muestreo de CO₂.

Los datos conseguidos en cada intervalo de tiempo fueron analizados por interpolación lineal (Muñoz et al., 2019), de acuerdo con la ecuación 2:

[Ec. 2]

$$y = \alpha x + \beta$$

Donde y es la emisión de gas diaria estimada, x corresponde a los días, α es la relación de cambio entre dos periodos de tiempo consecutivos (Ecuación 3):

[Ec. 3]

$$\alpha = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

[Ec. 4]

$$\beta = y_1 - \alpha x_1$$

Mientras que β corresponde a la intersección con y (Ecuación 4). Se consigue un modelo de ajuste; donde (X_1, Y_1) y (X_2, Y_2) representan dos periodos de tiempo distintos. La emisión acumulada del gas se logró con la suma de las emisiones obtenidas entre dos fechas contiguas para cada periodo durante toda la incubación (Muñoz et al., 2019).

2.10 Índices enzimáticos

Se utilizaron tres índices numéricos para evaluar el impacto de los tratamientos con biocarbones en las actividades enzimáticas de los vermicompost: el índice GMean (Hinojosa et al., 2004), el índice de calidad de suelos tratados (T- SQI; Mijangos et al., 2010), y el índice de respuesta biológica integrada versión 2 (IBRv2; Sanchez et al., 2012) modificado del índice IBR inicial (Beliaeff y Burgeot, 2002). Los cálculos para cada índice se detallan a continuación.

El índice GMean se calculó de acuerdo con la ecuación 5:

[Ec. 5]

$$GMean = (\prod_{i=1}^n y_i)^{1/n}$$

En donde y_i corresponde a la actividad enzimática y n es el número de enzimas evaluadas en los vermicompost.

El T-SQI se evaluó según la ecuación 6:

[Ec.6]

$$T - SQI = 10^{\log m + \frac{\sum_{i=1}^n (\log n_i + \log m) - \sum_{i=1}^n |\log n_i - \log \bar{n}|}{n}}$$

En donde m es el vermicompost control (T_1 ; promedio de la actividad enzimática, determinado en 100% como punto de referencia), y n es el promedio de cada actividad enzimática considerada en los vermicompost tratados con biocarbones, reflejados en porcentaje respecto al VC de referencia.

Finalmente, los valores de IBRv2 figuran como la suma de las desviaciones entre la referencia (T_1) y los vermicompost con biocarbones incorporados. Se calcula con la fórmula 7:

[Ec. 7]

$$IBRv2 = \sum_{i=1}^n |A_i|$$

En donde, A_i (ecuación 8) corresponde a un índice de desviación para cada actividad enzimática. Éste se calcula propiamente mediante la diferencia entre los datos estandarizados (Z_i) y el promedio estandarizado del tratamiento de referencia para este cálculo (Z_0):

[Ec. 8]

$$A_i = Z_i - Z_0$$

El valor de los datos estandarizados (Z_i) se obtiene mediante la ecuación 9, con el valor promedio general (μ), la desviación estándar (σ) y el factor Y_i .

[Ec.9]

$$Z_i = \frac{(Y_i - \mu)}{\sigma}$$

Éste último (Y_i), corresponde a la transformación logarítmica de la relación entre las actividades enzimáticas propias de cada tratamiento con biocarbón añadido y el tratamiento de referencia, según la ecuación 10:

[Ec. 10]

$$Y_i = \log \frac{X_i}{X_0}$$

Los valores de IBRv2 se ilustraron en gráficos de rayos solares para evaluar visualmente las respuestas enzimáticas de cada tratamiento respecto a la referencia.

2.11. Análisis estadísticos

Las variables cuantitativas determinadas se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANDEVA), previa comprobación de los supuestos de homogeneidad de varianzas (Test de Levene) y normalidad de residuos (Test de Shapiro Wilks). Para las emisiones de CO₂ y el índice GMean fue necesario aplicar una transformación logarítmica a los datos, puesto que no cumplían con los supuestos de homocedasticidad y normalidad respectivamente. Mientras que para los análisis enzimáticos se aplicó la prueba de Kruskal Wallis seguido de la prueba de Wilcoxon por pares para comparar las actividades enzimáticas. Aquellas variables que reflejaron diferencias significativas (ANOVA, p-valor $\leq 0,05$), fueron sometidos a la prueba de comparación de medias (LSD-Fischer). Los análisis estadísticos de los datos fueron realizados por medio del Software InfoStat versión estudiantil 2020 (Di Rienzo et al., 2020).

Adicionalmente, para las actividades enzimáticas, rendimiento, IG, emisiones de CO₂, N total, C total y relación C/N, se aplicó a un análisis de correlación de Spearman (p-

valor < 0.05) y un análisis de componentes principales (PCA), que permita visualizar y corroborar las interacciones entre las variables. Estos se realizaron con el software Jamovi (www.jamovi.org, ver. 2.3.3, 2022).

3. Resultados y discusión

3.1 Poblaciones de E. fetida y rendimientos

Las poblaciones de lombrices se mantuvieron estables en todos los tratamientos posterior al proceso de vermicompostaje. No varió el número de lombrices respecto a la población inicial en todos los tratamientos, habiendo un rango de 85-97 lombrices (Tabla 2). Este resultado contrasta con lo reportado en estudios anteriores, donde se obtiene un incremento en la tasa de reproducción posterior al experimento (Ferráz-Ramos *et al.*, 2022; Domínguez *et al.*, 2016). Lo anterior puede ser producto del prolongado tiempo al que se sometió el ensayo (5 meses) en función de la naturaleza de la biomasa suministrada; dado que del bagazo de uva contiene un 15% de semillas, que no son digeribles para las lombrices y además presentan una alta concentración de polifenoles, tóxicos para estos organismos (Cortés *et al.*, 2020; Poveda *et al.*, 2018). La duración del estudio se extendió considerando la baja en temperaturas durante el período de invierno y, por ende, evitar irregularidades en el proceso debido a este factor, siendo 25°C la temperatura óptima para *E. fetida* (Edwards, 1998); sin embargo, estudios anteriores validan un rango de temperaturas extremas para esta especie, fuera de su ratio óptimo (Garg y Gupta, 2011), decidiéndose aumentar el tiempo de vermicompostaje, siendo mayor al recomendado por Malińska *et al.* (2017) y Pérez-Godínez *et al.* (2017), quienes incluyeron al consumo diario de una lombriz como un parámetro relacionado a su peso corporal, por lo que según esto, el tiempo de este ensayo correspondía entre 7 a 14 semanas para evitar el agotamiento de sustrato. Nuestros resultados avalan que a pesar de la extensión del período no hubo disminución del alimento disponible ya que se registró solamente entre 3-15% de mortalidad de lombrices.

Los rendimientos mostraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos (p -valor $\leq 0,0001$), donde T₃ y T₄ presentan valores superiores a 300 g, en comparación

a los controles que presentaron las menores medias (T₀ y T₁; Tabla 2). Los mayores rendimientos en vermicompostajes combinados con otros elementos también se han registrado en estudios con lodos de papelería, que aportó en un mayor contenido de carbono orgánico, influyendo en mejorar la reproducción de *E. fetida* y rendimiento de vermicompost (Boruah et al., 2019).

Tabla 2. Recuento de lombrices en tiempo final y rendimiento de las enmiendas (g) en respuesta a los tratamientos aplicados.

Tratamiento	Lombrices	Rendimiento VC (g)
T ₀ : B	-	62,35 ± 2,61 c
T ₁ : B+E	97 ± 2,65	237,43 ± 30,80 b
T ₂ : B+E+BC ₁	85 ± 14,97	266,75 ± 38,69 b
T ₃ : B+E+BC ₂	90 ± 5,19	306,38 ± 16,81 a
T ₄ : B+E+BC ₃	94 ± 4,92	311,38 ± 15,37 a
p-valor	0,30	0,0001
CV %	9.2	10.29

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba LSD Fisher ($p \leq 0,05$). Media ± desviación estándar (n = 4). T₀: B; T₁: B+E; T₂: B+E+BC₁; T₃: B+E+BC₂; T₄: B+E+BC₃.

3.2. Propiedades químicas

Las propiedades químicas se vieron influenciadas por los tratamientos aplicados. En general, los valores de pH se mantienen semejantes excepto el valor más bajo de T₂ (4,92) y el más alto de T₄ (6,61). En cuanto a materia orgánica (MO), se observan valores en rango de 65-90%. Se evidenció una relación C/N entre 11,69-14,55, existiendo diferencias altamente significativas en los tratamientos (p-valor < 0,0001), siendo T₁ y T₃ los que menor valor alcanzaron. Para N total, se obtuvieron medias similares entre 3-3,7%. Sin embargo, en C total medias desde 35-48,4%, siendo la menor correspondiente a T₄ (35%).

Con relación a los macronutrientes se registró un mayor valor de N en T₂ (1612,3 mg kg⁻¹), para P en T₃ (11,42 g kg⁻¹) y K con T₀ (26,64 g kg⁻¹), mientras que umbrales

mínimos de los mismos nutrientes se obtuvieron para N en T₀ (354,6 g kg⁻¹), P con T₂ (2,83 g kg⁻¹) y K en T₄ (18,01 g kg⁻¹). Para Ca, se alcanzó el mayor valor en T₄ (74,07 g kg⁻¹) y su mínimo valor en T₂ (6,51 g kg⁻¹). El resto de los nutrientes se determinaron sus umbrales máximos de contenido en T₃, Mg (4,70 g kg⁻¹), Mn (273 mg kg⁻¹), Cu (88 mg kg⁻¹) y B (48 mg kg⁻¹), en cuanto a sus rangos mínimos, se registraron en T₂ para Mg (1,93 mg kg⁻¹) y Cu (39 mg kg⁻¹), T₄ para Mn (22 mg kg⁻¹), y T₀ para B (30 mg kg⁻¹).

Tabla 3. Caracterización química de los productos en tiempo final de incubación como respuesta a los tratamientos aplicados.

Parámetros	Unidades	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	p- valor
pH (1:5)	--	5,51	5,03	4,92	5,76	6,61	-
MO	%	90,66	84,99	85,98	78,37	65,62	-
N Total	%	3,56 ± 0.15 ab	3,74 ± 0.18 a	3,33 ± 0.06 b	3,66 ± 0.12 a	2,94 ± 0.28 c	<0,0001
C total	%	46,60 ± 0.18 a	43,65 ± 1.91 b	48,40 ± 3.10 a	42,73 ± 1.23 b	35,00 ± 1.69 c	<0,0001
Relación C/N	--	13,10 ± 0.53 b	11,69 ± 0.18 c	14,55±1.12 a	11,69 ± 0.11 c	11,97 ± 0.58 c	<0,0001
Nitratos (N-NO₃)	mg kg ⁻¹	291,90	1325,6	1539,6	555,80	734,1	-
Amonio (N-NH₄)	mg kg ⁻¹	62,70	85,10	72,70	60,20	50,30	-
N disp.	mg kg ⁻¹	354,6	1410,7	1612,3	616	784,4	-
P disp.	g kg ⁻¹	3,36	3,62	2,83	11,42	8,33	-
K disp.	g kg ⁻¹	26,64	22,08	18,43	18,68	18,01	-
Ca disp.	g kg ⁻¹	7,29	7,72	6,51	13,44	74,07	-
Mg disp.	g kg ⁻¹	2,41	2,29	1,93	4,70	3,38	-
Mn	mg kg ⁻¹	42	105	108	273	22	-
Cu	mg kg ⁻¹	52	48	39	88	53	-
B	mg kg ⁻¹	30	41	32	48	37	-
Humedad BH	%	69,3	69,2	68,1	65,4	62,9	-

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba LSD Fisher ($p \leq 0.05$). Media ± desviación estándar ($n = 4$). T₀: B; T₁: B+E; T₂: B+E+BC₁; T₃: B+E+BC₂; T₄: B+E+BC₃

Hirzel y Salazar (2016), informaron rangos referenciales de parámetros químicos de enmiendas orgánicas utilizadas en Chile como el vermicompostaje de residuos

ganaderos, donde la relación C/N se sitúa en el intervalo entre 20-28; valores distantes de los obtenidos en este estudio, que a nivel general evidencia a todos los tratamientos en condiciones por debajo del umbral mínimo, siendo el más alto T₂; coherente con la naturaleza del biocarbón aplicado, proveniente de un material abundante en compuestos lignocelulósicos que le confieren un mayor contenido de C total (Tabla 1), y que, no obstante, presentó una importante reducción de la relación C/N posterior al vermicompostaje (Tabla 4). Sin embargo, es de igual importancia el material base utilizado (Wang et al., 2019). El bagazo de uva destaca como un residuo alto en contenido de materia orgánica, abundante en macronutrientes y de baja relación C/N (Requejo et al., 2016; Domínguez et al., 2017; Biruntha et al., 2020), que permite, por ende, generar productos finales de similares características. Biruntha et al. (2020) estudiaron el vermicompostaje de distintos materiales con amplias variaciones en la relación C/N en donde demostraron que residuos con una baja relación inicial (C/N = 23) produjeron un vermicompost con C/N =11 en comparación con otros materiales con valores más elevados. Entendiendo que la relación entre ambos elementos es esencial en procesos de naturaleza biológica, al entregar una nutrición adecuada a las lombrices de tierra (Lv et al., 2018) y la multiplicación microbiana (Jiang et al., 2011), siendo igualmente un indicador clave de la madurez de la enmienda evaluada. Se ha evidenciado que la disminución de la relación C/N es mayor en vermicompostaje que en compostaje (Biruntha et al., 2020), principalmente debido a la aceleración de la pérdida de carbono orgánico, producto de la tasa de actividad intensa de las lombrices al consumir la materia orgánica, de la microbiota presente y la liberación de CO₂ mediada por la respiración de los organismos participantes del proceso (Sharma y Garg, 2018; Boruah et al., 2019), por lo que, a nivel descriptivo, era esperable una menor respuesta de T₀ en términos químicos. Sin embargo, cabe destacar, a nivel general, una mayor concentración nutricional en T₃, posiblemente producto de la naturaleza del biocarbón aplicado, proveniente de residuos de un plantel porcino y que ha sido reportado como un material con alta tasa de mineralización, frente a otros desechos de similares características (Hirzel, 2021).

3.3. Índice de germinación (IG)

Para evaluar una potencial fitotoxicidad de estos productos y por ende la madurez de estos, se considera el cálculo del IG, mediante la aplicación extractos de cada tratamiento sobre semillas de rábano. Los resultados indican que no existen efectos negativos en la germinación y emergencia de las semillas, mostrando mayor desarrollo de la longitud radicular (LR) en todos los tratamientos por sobre el control absoluto, que figura como base del eje Y en las gráficas (Figura 1a y 1b; IG= 100% y LR= 3,81 cm). El mayor valor obtenido tanto en LR (5,64 cm \pm 0.08) como en IG (164,3% \pm 2.19) se observó en T₁. Los productos aplicados con biocarbón (T₂, T₃ y T₄) mostraron diferencias altamente significativas entre sí (p-valor < 0,0001; CV= 2,88%), y evidenciaron efectos positivos sobre este parámetro en comparación a T₀, que obtuvo el menor IG (106,89 \pm 7,15 %) y LR (4,1 \pm 0,27 cm).

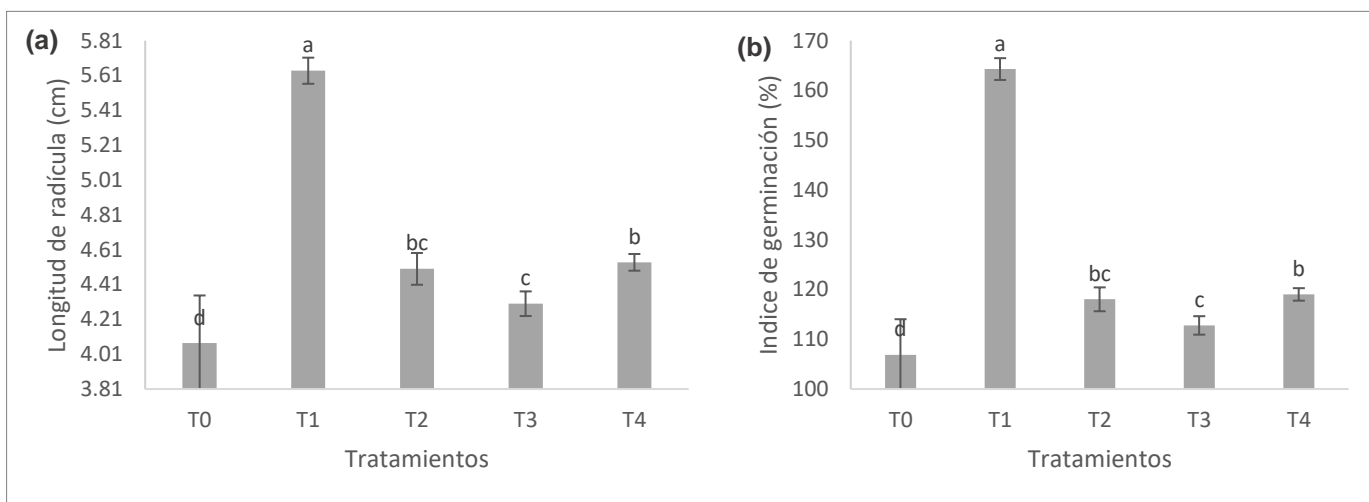


Figura 1. Índice de germinación de rábano en respuesta a los tratamientos aplicados. **(a)** Longitud de radícula (cm); **(b)** índice de germinación (%). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba LSD Fisher ($p \leq 0,05$). Barras de error \pm desviación estándar ($n = 4$). T₀: B; T₁: B+E; T₂: B+E+BC₁; T₃: B+E+BC₂; T₄: B+E+BC₃.

El IG evidencia el grado de madurez y estabilización del material orgánico, funciona como un indicador con relación a promover o no el crecimiento inicial de las plantas (Bhat et al., 2017). En nuestro estudio se obtuvieron valores adecuados para este

parámetro, superando ampliamente el umbral mínimo del 80% recomendado para vermicompost (Hao et al., 2021), evidenciando materiales estabilizados y libres de compuestos fitotóxicos que inhibieran la germinación y emergencia (Villar et al., 2016)., Se destaca el menor IG en T₀ (Bagazo) versus los tratamientos vermicompostados. El incremento en el IG radica en la descomposición de los sustratos orgánicos (Bhat et al., 2017), generando un mayor contenido de nutrientes disponibles y sustancias promotoras del crecimiento vegetal, provenientes de la actividad bacteriana y enzimática en el aparato digestivo de las lombrices (Banerjee et al., 2019), siendo el vermicompostaje un proceso positivamente relacionado a organismos como las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR; Triharyanto et al., 2021)); por lo que se justifica un menor IG en T₀, al ser un proceso ausente de lombrices e impulsado solamente por la actividad microbiológica y enzimática del bagazo per se (Sun et al., 2016). Sin embargo, en T₁ se observa el mayor incremento superando el 160%, causado por la disponibilidad inmediata de nutrientes que estimula la emergencia y desarrollo radicular, en cambio para los demás tratamientos (T₂, T₃ y T₄), se observan medias entre 110 a 120%, donde el biocarbón actúa como un agente de retención de nutrientes en su matriz carbonosa influenciado por su alta CIC (Sanchez-Monedero et al., 2018), generando una leve disminución en la longitud de radícula en la fase inicial de germinación.

3.4. Respiración microbiana

Se identificaron diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$; CV=26,6%) entre los tratamientos aplicados, observándose las mayores respiraciones acumuladas en T₀ ($4,04 \pm 0,9 \mu\text{g C mg C}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y T₄ ($2,45 \pm 0,3 \mu\text{g C mg C}^{-1} \text{ h}^{-1}$); mientras la menor registrada se situó en T₃ ($1,40 \mu\text{g C mg C}^{-1} \text{ h}^{-1} \pm 0,24$), siendo estadísticamente igual a T₁ ($1,75 \pm 0,2 \mu\text{g C mg C}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y T₂ ($1,44 \pm 0,23 \mu\text{g C mg C}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

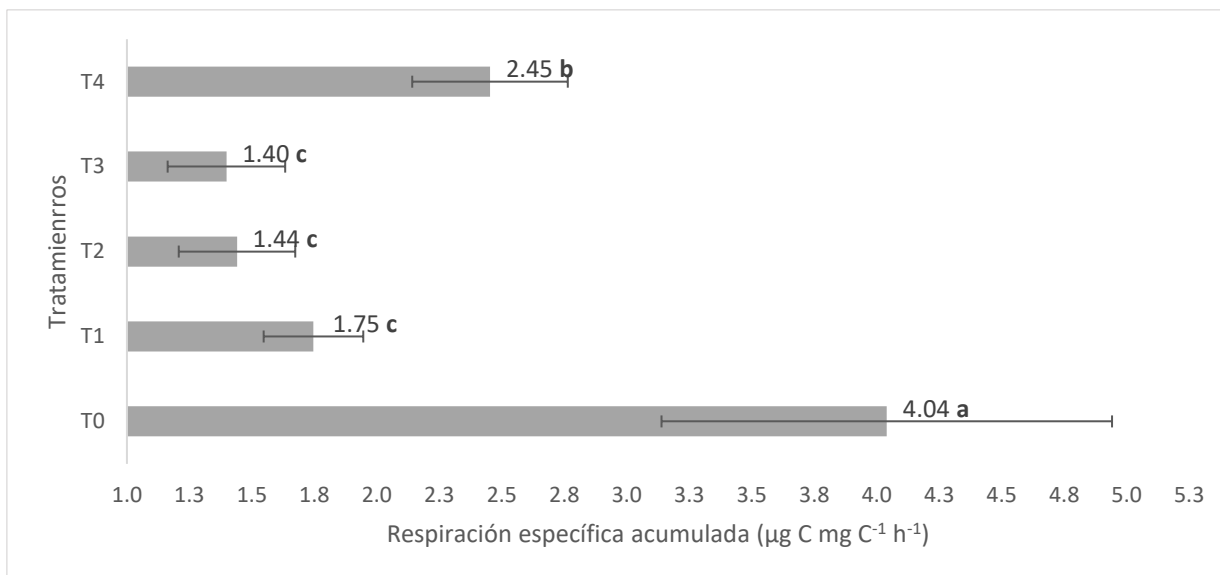


Figura 2. Respiración específica acumulada ($\mu\text{g C mg C}^{-1} \text{h}^{-1}$) durante siete días de incubación para cada tratamiento. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba de LSD-Fischer ($p\text{-valor} \leq 0,05$). **T₀**: B; **T₁**: B+E; **T₂**: B+E+BC₁; **T₃**: B+E+BC₂; **T₄**: B+E+BC₃.

Nuestro estudio muestra que la adición de biocarbón aceleró la maduración de los vermicompostajes, reflejado en la evaluación de la respiración microbiana, donde se identifica una menor emisión de CO₂ en T₃, T₂ y T₁, a excepción de T₄, único tratamiento con material pirolizado añadido que presentó valores superiores en las emisiones de CO₂, y que podría ser producto del elevado contenido de CaCO₃ que contiene el material base proveniente de plántulas avícolas y que también explica su elevado contenido de Ca en el producto final (Ginebra et al., 2022). Las emisiones de CO₂ están relacionadas a las dos fases principales del vermicompostaje. Santana et al. (2020), evaluaron el vermicompostaje de orujo de uva durante dos años, donde obtuvieron la máxima producción de CO₂ en los primeros 30 días, producto de la intensa actividad de las lombrices y microorganismos; mientras que este valor decae significativamente en el transcurso de la fase de estabilización (Santana et al., 2020; Ferráz-Ramos et al., 2022). Por lo que menores emisiones de este gas, representa el resultado de un producto maduro en un menor período de tiempo, comparado con mayores emisiones de CO₂ de un producto en vías de estabilización como T₀, que

presenta una amplia diferencia con los tratamientos vermicompostados. Por lo que este estudio refleja un impacto directo de los biocarbones en acelerar el vermicompostaje de forma eficiente, reduciendo la emisión constante de GEI como el CO₂, teniendo en cuenta el tipo de biocarbón utilizado.

3.5 Actividad enzimática e índices globales

Se evaluaron nueve actividades enzimáticas en función de la susceptibilidad que presentan a cambios en un sustrato como el suelo, adicionalmente del análisis de dos o más actividades enzimáticas por ciclo biogeoquímico (Lessard et al., 2014). Se designó T₁ como control para estos análisis debido a que este tratamiento cuenta con adición de lombrices en comparación con T₀ y sin la presencia de biocarbones añadidos.

Se identificaron diferencias significativas entre los tratamientos solamente para FDA (p-valor = 0,005; Tabla 5); se reflejó una mayor actividad en T₂ (16,22 µg F g⁻¹) y T₁ (13,62 µg F g⁻¹). Mientras que T₄ y T₃ de forma descendente presentan la menor actividad FDA con 7,40 y 5,53 µg F g⁻¹ respectivamente. No se presentan diferencias estadísticamente significativas en los demás grupos enzimáticos.

Un análisis global de estas actividades se detalla mediante la aplicación de índices enzimáticos sobre los vermicompost.

Tabla 4. Actividad enzimática de los vermicompost en tiempo final de incubación como respuesta a los tratamientos aplicados.

Act. Enzimática	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	p-valor
Des (µmol INFT h ⁻¹ g ⁻¹)	1,96 ± 0,76	2,41 ± 0,18	1,47 ± 0,34	2,68 ± 0,70	0,11
Cat (mmol H ₂ O ₂ h ⁻¹ g ⁻¹)	91,13 ± 7,61	73,84 ± 8,51	79,35 ± 37	93,80 ± 15,66	0,15
Est 1-NB (µmol h ⁻¹ g ⁻¹)	374,55 ± 245,6	331,19 ± 204,3	192,05 ± 69,9	347,52 ± 224,9	0,41
Est 4-NPB (µmol h ⁻¹ g ⁻¹)	2298,76 ± 900,8	1463,25 ± 436,8	992,97 ± 657,1	1442,99 ± 576,5	0,13
Fos. Ac (µmol h ⁻¹ g ⁻¹)	38,37 ± 12,92	28,87 ± 8,73	34,42 ± 10	35,34 ± 16,84	0,78
Glu (µmol h ⁻¹ g ⁻¹)	8,29 ± 3,15	8,96 ± 3,14	8,75 ± 4,26	15,73 ± 5,04	0,11

Prot (mg Tyr eq h ⁻¹ g ⁻¹)	13,53 ± 2,22	12,49 ± 1,15	11,85 ± 5,62	13,57 ± 1,28	0,46
Ure (µg NH ₄ ⁺ h ⁻¹ g ⁻¹)	213,69 ± 39,27	188,71 ± 21,47	143,60 ± 45,96	169,91 ± 40,16	0,29
FDA (µg F g ⁻¹)	13,62 ± 1,84 a	16,22 ± 5,59 a	5,53 ± 0,43 b	7,40 ± 0,62 ab	0,005

Deshidrogenasa (Des), catalasa (Cat), esterasa 1-NB (Est-1NB), esterasa 4-NPB (Est-4NPB), fosfatasa ácida (Fos. Ac), β-glucosidasa (Glu), proteasa (Prot), ureasa (Ure) y Biomasa microbiana (FDA) por tratamientos. Media ± desviación estándar (n = 4). T₁: B+E; T₂: B+E+BC₁; T₃: B+E+BC₂; T₄: B+E+BC₃.

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas de según la prueba de Kruskal Wallis (p-valor ≤ 0,05).

Se aplicaron los índices GMean, T-SQI y el índice IBRv2 con la finalidad de evaluar el efecto de los biocarbones sobre la actividad enzimática de los vermicompost; sus valores detallados se muestran en la Tabla 6. Para los índices T-SQI e IBRv2 no se calculó una puntuación propia para el tratamiento control (T₁), ya que fue utilizado dentro de los cálculos como base para obtener las puntuaciones respectivas de los demás tratamientos evaluados.

El índice GMean entrega una visión global del conjunto enzimático. Se identificaron diferencias significativas solamente para T₃ en comparación con los demás tratamientos, siendo éste el que consta del menor valor para este índice (32,93). El umbral máximo de puntuación se encuentra en un rango entre 45,44 – 48,58.

T-SQI evidencia la magnitud de los cambios provocados por un factor externo (por ejemplo, contaminantes o enmiendas) en las actividades de las enzimas de un suelo tratado en comparación con las de un suelo sin tratar (Epelde et al., 2014). En este estudio, como factor externo se consideraron los materiales pirolizados. Los valores de T-SQI fueron estadísticamente distintos en todos los tratamientos, reflejando una disminución significativa de la actividad enzimática en T₂ y T₃ de forma descendente (Tabla 6).

Finalmente, el índice IBRv2 a pesar de obtener valores promedio distintos, su variabilidad no permitió determinar diferencias estadísticas entre los tratamientos, registrando valores altos en la desviación estándar.

Tabla 5. Actividad enzimática global reflejada mediante las puntuaciones de índices T-SQI, IBRv2 y GMean para vermicompost al tiempo final de incubación.

Tratamientos*	T-SQI	IBRv2	GMean
T ₁	-	-	48,58 ± 10,3 a
T ₂	64,58 ± 10,7 ab	2,49 ± 1.03	43,33 ± 2,9 a
T ₃	45,95 ± 14,6 b	8,93 ± 7.36	32,93 ± 10,2 b
T ₄	69,04 ± 9,6 a	1,16 ± 2.1	45,44 ± 5,6 a
p-valor	0,05	0,07	0,04

*T₁: B+E; T₂: B+E+BC₁; T₃: B+E+BC₂; T₄: B+E+BC₃.

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas de según la prueba de LSD-Fischer (p-valor ≤ 0,05).

En el diagrama de rayos (Figura 3a) se observa el detalle de estas puntuaciones, donde hay una tendencia similar a la obtenida con GMean. Se evidencia una mayor incidencia positiva a nivel enzimático en T₄, específicamente en deshidrogenasa, β-glucosidasa y catalasa. Así mismo T₂, refleja un estímulo enzimático solamente en las actividades deshidrogenasa y FDA. Mientras que T₃, presenta una disminución drástica ambos índices, con una disminución enzimática en el vermicompost, en donde todas las actividades analizadas se encuentran por debajo del umbral de referencia.

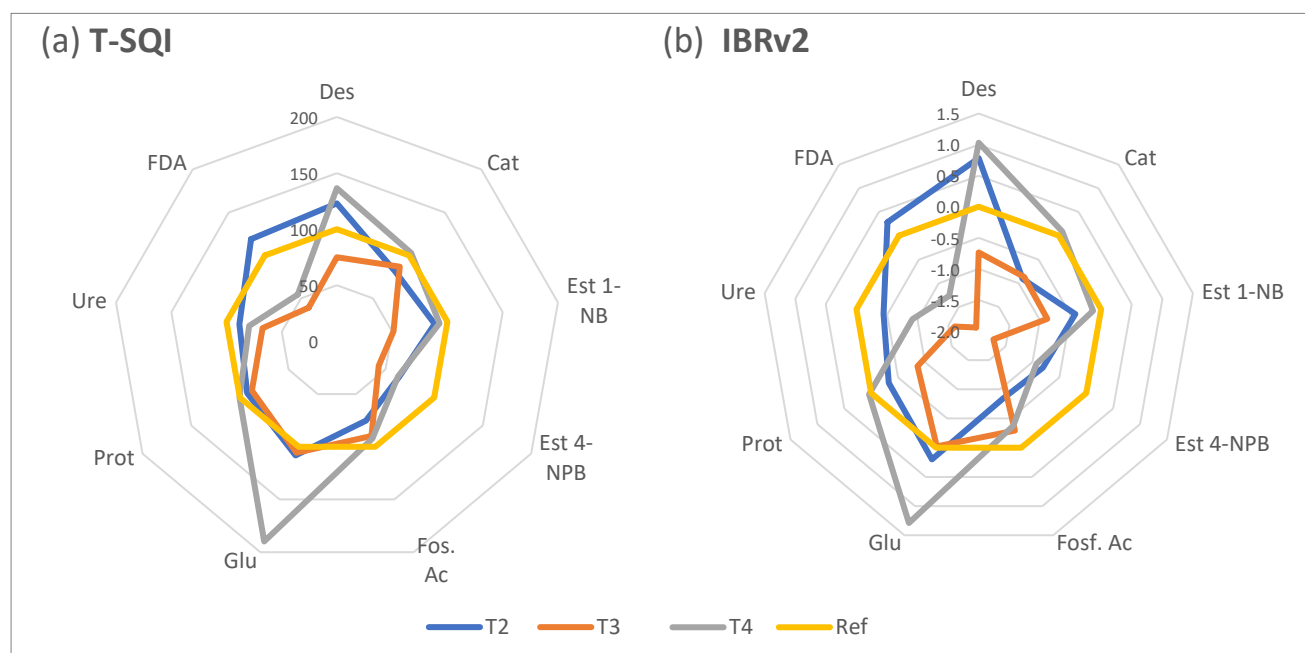


Figura 3. Respuesta global enzimática para vermicompost con biocarbones añadidos mediante la distribución de las puntuaciones (a) T-SQI e (b) IBRV2. T₂: B+E+BC₁; T₃: B+E+BC₂; T₄: B+E+BC₃.

Respecto al vermicompostaje, existe un aumento de la actividad enzimática durante su etapa inicial (Ferráz-Ramos et al., 2022), destacando el incremento de las actividades relacionadas al carbono, como α -glucosidasa y β -glucosidasa producto de una mayor cantidad de microorganismos en presencia de lombrices (Gómez-Brandón et al., 2022). Las lombrices son consideradas como impulsoras de la actividad microbiológica, permiten que enzimas digestivas (β -glucosidasa, ureasa y fosfatasa) derivadas del mucus de su piel fabricado por células epiteliales, subcutáneas y gastrointestinales (Ghosh et al., 2018), consuman los compuestos lábiles, dando lugar a compuestos inorgánicos (Cao et al., 2021). Además, biocarbones provenientes de paja de trigo y maíz han sido descritos como aditivos abundantes en C que permiten mejorar el metabolismo de carbohidratos (Zhou et al., 2019), mediante la degradación de celulosa y hemicelulosa; además de impulsar otras actividades como ureasa e invertasa en su fase inicial (Cao et al., 2021), permitiendo acelerar el transcurso de esta fase en el vermicompostaje.

La etapa de maduración/estabilización conlleva un decremento tanto en la actividad microbiana como enzimática, producto de la baja disponibilidad de materia fresca (Gómez-Brandón et al., 2020). En el presente estudio los tratamientos evaluados presentaron puntuaciones bajo la referencia (T₁), a excepción de T₄ con una mayor actividad deshidrogenasa, β -glucosidasa, altos valores en respiración microbiana (Figura 2) y abundante en carbonato (Tabla 1); mientras T₃ muestra una menor actividad enzimática global, que explicaría su estado en la fase de maduración avanzada.

Se obtuvo una correlación positiva y altamente significativa entre los índices T-SQI e IBR-v2, analizado mediante la prueba de Spearman ($r=0.87$; $p=0.004$; $n=12$) y un análisis de regresión lineal.

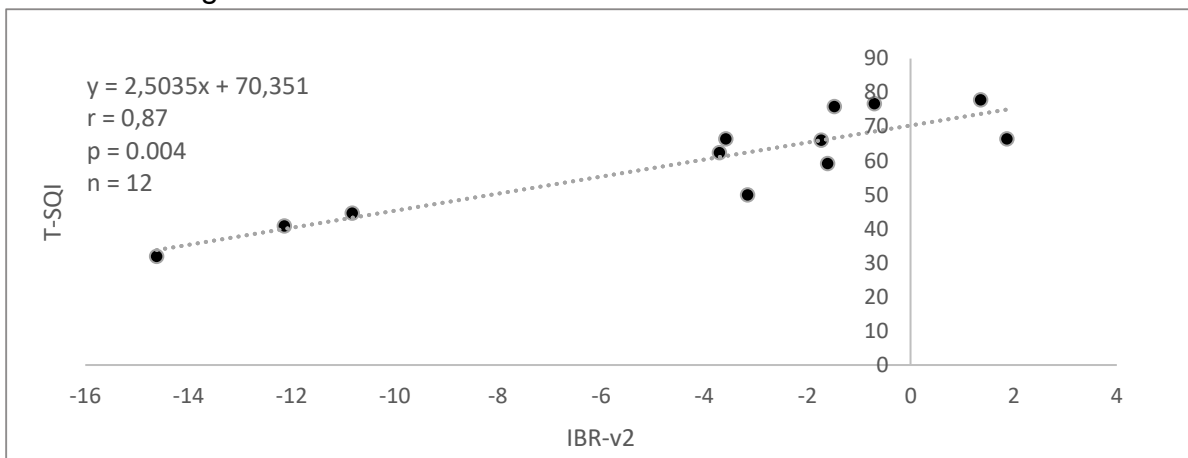


Figura 4. Relación entre las puntuaciones T-SQI e IBRv2, en respuesta a las actividades enzimáticas de vermicompost con biocarbones añadidos.

En estudios previos, la aplicación del T-SQI se recomienda para la evaluación de la calidad de un suelo tratado con enmiendas para aumentar así su actividad biológica (Mijangos et al., 2010). Sin embargo, igualmente se ha utilizado de forma exitosa para la evaluación a corto plazo de la respuesta enzimática en presencia de pesticidas en suelos agrícolas (Sanchez-Hernandez et al., 2017). Así mismo, el índice IBRv2 ha sido utilizado para evaluar el estado de la salud de animales habitantes de ambientes bajo contaminación (Sánchez et al., 2012), el riesgo ecológico de ecosistemas acuáticos (Vieira et al., 2016), además de la respuesta enzimática en suelos incididos por especies endogeicas de lombrices (Jouni et al., 2023). Por lo anterior, la aplicación de estas herramientas en contextos variados nos permitió igualmente utilizarlas con la finalidad de obtener una respuesta enzimática global en los vermicompost tratados con aditivos poco estudiados en vermicompostaje como los biocarbones.

3.7 Correlaciones

Se elaboró una matriz de correlación según la prueba de Spearman (Figura 5), compuesta de las nueve variables enzimáticas, tres variables químicas (C, N y C/N), IG, rendimiento y respiración microbiana; a fin de evidenciar las relaciones positivas o

negativas que influyen en los resultados del estudio frente a la adición de biocarbones en los vermicompost.

Se observó una correlación positiva entre las actividades enzimáticas (a excepción de la actividad fosfatasa), los que a su vez se relacionaron positivamente con la respiración microbiana ($r = 0,5$ para FDA y $r = 0,93$ para la actividad proteasa). Así mismo, el contenido de C total influye directamente en la actividad FDA ($r = 0,88$). La actividad fosfatasa presenta relación directa con el IG ($r = 0,79$) y rendimiento ($r = 0,94$), que presentan igualmente correlaciones positivas entre sí ($r = 0,7$).

La correlación de rendimiento presentó una relación inversa con parámetros de naturaleza biológica, con valores negativos en FDA ($r = -0,86$), C total ($r = -0,82$), relación C/N ($r = -0,69$), esterasa 4-NPB ($r = -0,59$) respiración microbiana ($r = -0,57$) y glucosidasa ($r = -0,53$). El IG presenta una relación inversa para la respiración microbiana y glucosidasa ($r = -0,62$ en cada uno), FDA ($r = -0,54$), proteasa ($r = -0,53$), C total ($r = -0,50$) y relación C/N ($r = -0,48$). Mientras que la actividad de la fosfatasa igualmente arroja relación inversa a parámetros biológicos como el C total ($r = -0,78$), FDA ($r = -0,77$), relación C/N ($r = -0,71$), respiración microbiana ($r = -0,57$) y glucosidasa ($r = -0,55$).

Estos valores de correlación mencionados anteriormente nos permiten visualizar las interacciones de las variables biológicas y bioquímicas en ambas fases del vermicompostaje (fase de activación enzimática y biológica, y fase de maduración).

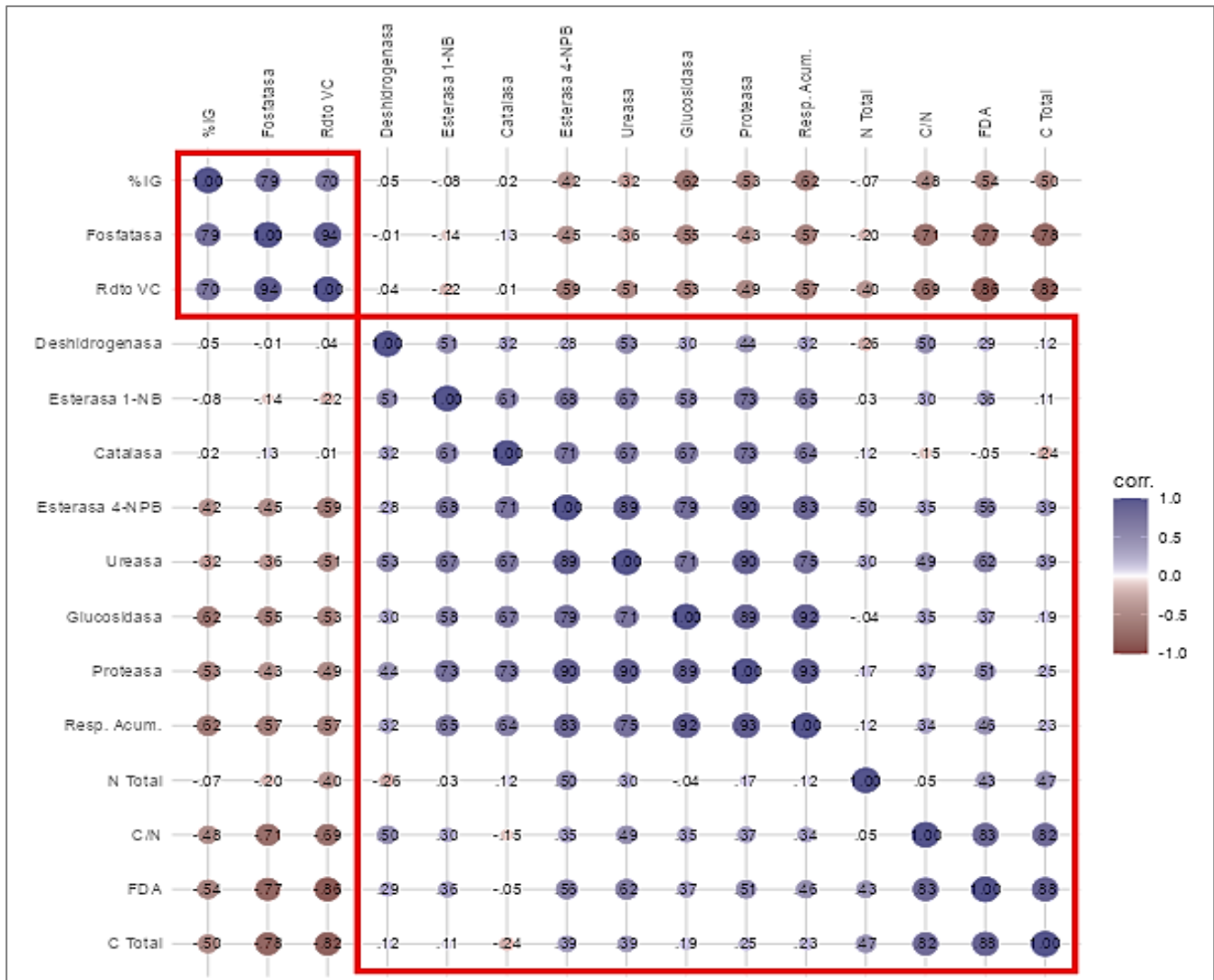


Figura 5. Matriz de correlación según la prueba de Spearman para índice de germinación (IG), actividad fosfatasa (Fos. Ac), rendimiento (Rdto VC), actividad deshidrogenasa (Des), actividad esterasa 1-NB (Est 1-NB), actividad catalasa (Cat), actividad esterasa 4-NPB (Est 4-NPB), actividad ureasa (Ure), actividad glucosidasa (Glu), actividad proteasa (Prot), respiración específica acumulada (RM), N total, C total, relación C/N (C/N) y biomasa microbiana (FDA) en respuesta a los tratamientos aplicados. Valores coloreados en tonos azules y rojos indican correlación positiva y negativa respectivamente. Aquellos sin color tienen correlación insignificante.

El análisis de componentes principales (PCA), se realizó para las mismas mediciones. PC1 y PC2 explicaron el 34,43% y 18,17% de la variación de los datos

respectivamente. Estos igualmente se representan como vectores en el PCA de variables (Figura 6b), que corrobora las observaciones obtenidas a partir de la matriz de correlación anterior.

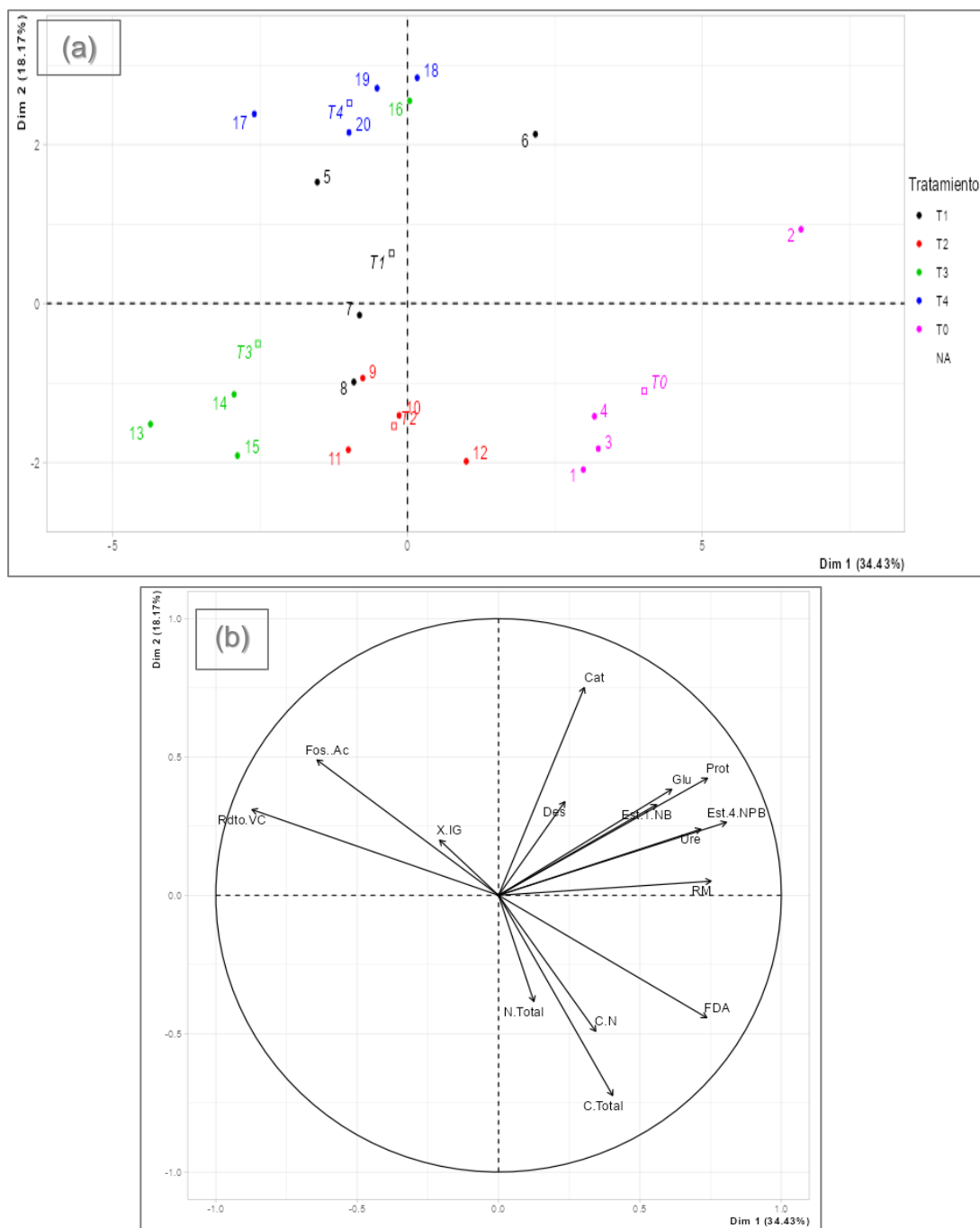


Figura 6. Análisis de componentes principales (PCA) para índice de germinación (IG), actividad fosfatasa (Fos. Ac), rendimiento (Rdto VC), actividad deshidrogenasa (Des),

actividad esterasa 1-NB (Est 1-NB), actividad catalasa (Cat), actividad esterasa 4-NPB (Est 4-NPB), actividad ureasa (Ure), actividad glucosidasa (Glu), actividad proteasa (Prot), respiración específica acumulada (RM), N total, C total, relación C/N (C/N) y biomasa microbiana (FDA) determinados para enmiendas orgánicas en ausencia y presencia de lombrices y biocarbonos. (a) PCA de individuos: los tratamientos están representados por los números 1-4 para T₀: B; 5-8 para T₁: B+E; 9-12 para T₂: B+E+BC₁; 13-16 para T₃: B+E+BC₂ y 17-20 para T₃: B+E+BC₂. (b) PCA de variables.

Tanto en la matriz de correlación como en el PCA se refleja una relación inversa entre las variables biológicas y aquellas relacionadas con la madurez de los vermicompost, como el rendimiento y el IG. Los resultados de nuestro estudio coinciden con investigaciones previas (Santana et al., 2020; Ferraz Ramos et al., 2022), que explican estas correlaciones negativas a las distintas fases del proceso de vermicompostaje, gracias al aprovechamiento de moléculas fácilmente asimilables (como carbohidratos simples) producto de la fragmentación asistida por las lombrices y la acción microbiana durante la fase inicial (Santana et al., 2020); esto último también explica la relación altamente positiva entre las distintas variables biológicas, donde enzimas como la β -glucosidasa, esterasas, aquellas relacionadas al N y la respiración microbiana coinciden en las direcciones de sus vectores en el PCA de variables (Figura 6b); la FDA está mayormente relacionada con el contenido de C total y a la relación C/N; mientras que estas últimas se distancian de la respiración microbiana, puesto que la pérdida de C acelerada por las emisiones de CO₂ reducen la relación C/N (Li et al., 2020). Por su parte, las variables de rendimiento e IG se relacionan positivamente de acuerdo con ambos análisis multivariados; estos parámetros se asocian principalmente a la segunda fase del vermicompostaje, posterior a 45 días de iniciado, con la reducción de alimento fácilmente digerible y el aumento de materia orgánica humificada (Khatua et al., 2018), consolidando la madurez del producto obtenido. Sin embargo, también se asocian a la actividad de la fosfatasa ácida, enzima que aumenta su actividad en esta fase producto de la estabilización del pH del sustrato en esta etapa (García-Sánchez et al., 2017). Finalmente, en el PCA de individuos (Figura 6a) se

observa un detalle de las discusiones anteriores pero referentes a las muestras individualmente. De acuerdo con los estudios previos de Santana et al. (2020) y Ferraz-Ramos et al. (2022), las variables pueden segmentarse en el PCA según su fase en el vermicompostaje, situándose aquellas relacionadas a los primeros 45 días en los cuadrantes que explican el mayor porcentaje de la variabilidad de los datos, relacionados a la actividad biológica; mientras que los relacionados a la estabilidad del sustrato se sitúan hacia los cuadrantes que reducen la variabilidad de los datos.

La aplicación de biocarbones en este estudio apoyó el desarrollo exitoso del vermicompostaje sin afectar las poblaciones de lombrices y promoviendo el desarrollo microbiano en el sustrato. Las secreciones intestinales de las lombrices poseen hasta un 80% de contenido compuesto por proteínas y polisacáridos (Horn et al., 2003), fácilmente colonizables por microorganismos y enzimas en presencia de biocarbones que albergan estas actividades al proveer el aumento del área superficial porosa y sitios de acción (Hazrati et al., 2020).

Si bien, no se destacan diferencias notorias entre todos los tipos de biocarbones en la estabilización de los vermicompost en comparación al vermicompostaje sin presencia de este aditivo, si se destaca el T₃, al ser la aplicación que evidencia el mayor estado de madurez de acuerdo con los análisis realizados y en coherencia con las características de la segunda fase del vermicompostaje, por lo que este biocarbón permitió acelerar aún más el proceso; principalmente debido al mayor valor fertilizante de este aditivo y su baja fracción recalcitrante (Subedi et al., 2016), proveniente del estiércol de planteles porcinos, que permite añadir al proceso componentes minerales que facilitan el desarrollo enzimático y el rápido consumo de compuestos orgánicos lábiles (Gómez-Brandón et al., 2019), en comparación con los demás biocarbones provenientes de materias primas abundantes en compuestos lignocelulósicos y carbonatos. La escasa diferenciación de estos últimos en este estudio radica en las características de los biocarbones añadidos; el BC₁, por ejemplo, proviene de residuos leñosos, que consta de un pH relativamente ácido y un alto contenido de C total, pero proveniente de carbohidratos complejos de lenta degradación; sin embargo, debido a su alta porosidad y superficie expuesta (Hassan et al., 2020) su uso se ha reportado

exitosamente en la inmovilización de Cu en suelos (Moore et al., 2018). Mientras que el BC₃, proveniente de residuos de plántulas avícolas, posee un pH alcalino, además de altos contenidos de calcio y carbonatos que prolongan en el tiempo las emisiones elevadas de CO₂ (Grutzmacher et al., 2018) en el vermicompostaje aún pasada la fase inicial.

4. Conclusiones

La adición de biocarbones provenientes de sistemas forestales y ganaderos a una dosis del 2% son efectivos en el vermicompostaje de bagazo de uva, generando aumentos en los rendimientos finales sin tener una implicancia negativa en las lombrices.

Los biocarbones de origen ganadero permitieron acelerar la estabilización de la materia orgánica, reflejado en la reducción de la relación C/N y emisiones CO₂, exceptuando el BC de cama de ave que aumentó las emisiones de CO₂ un 75% comparado a BC de estiércol de cerdo. Además, el BC de estiércol de cerdo redujo significativamente las actividades enzimáticas reflejado en el índice GMean y T-SQI indicando una acelerada fase de maduración del vermicompost.

La respuesta al proceso de vermicompostaje depende del origen de BC utilizado, siendo el BC de residuos de madera el que menos impacto tuvo en el proceso de estabilización del vermicompost.

Estos resultados aportan a generar una base científica para abordar futuros estudios relacionados a procesos de vermicompostaje utilizando biocarbones o materiales carbonosos como agentes estabilizadores.

5. Referencias

- Agegnehu, G., Srivastava, A.K., Bir, M.I. 2017. The role of biochar and biochar-compost in improving soil quality and crop performance: A review. *Applied Soil Ecology*. 119, 156-170.
- Ahmad, B., Yadav, V., Yadav, A., Rahman, M.U., Yuan, W.Z., Li, Z., Wang, X. 2020. Integrated biorefinery approach to valorize winery waste: A review from waste to energy perspectives. *Science of the Total Environment*. 719, 137315.
- Alef, K., Nannipieri, P. 1995. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press.
- Antonić, B., Jančíková, S., Dordević, D., Tremlová, B. 2020. Grape Pomace Valorization: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Foods*. 9(11), 1627.
- Banerjee, A., Biswas, J.K., Pant, D., Sarkar, B., Chaudhuri, P., Rai, M., Meers, E. 2019. Enteric bacteria from the earthworm (*Metaphire posthuma*) promote plant growth and remediate toxic trace elements. *Journal of Environmental Management*, 250, 109530.
- Beliaeff, B., Burgeot, T. 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(6), 1316-1322.
- Bhat, S. A., Singh, J., Vig, A.P. 2017. Instrumental characterization of organic wastes for evaluation of vermicompost maturity. *Journal of Analytical Science and Technology*, 8(1).
- Bhat, S.A., Singh, J., Vig, A.P. 2018. Earthworms as organic waste managers and biofertilizer producers. *Waste and Biomass Valorization*. 9 (7): 1073-1086.
- Biruntha, M., Karmegam, N., Archana, J., Karunai Selvi, B., John Paul, J.A., Balamuralikrishnan, B., Chang, S.W., Ravindran, B. 2020. Vermiconversion of biowastes with low-to-high C/N ratio into value added vermicompost. *Bioresource Technology*, 297, 122398.

- Boruah, T., Barman, A., Kalita, P., Lahkar, J., Deka, H. 2019. Vermicomposting of citronella bagasse and paper mill sludge mixture employing *Eisenia fetida*. *Bioresource Technology*, 294, 122147.
- Cao, Y., Tian, Y., Wu, Q., Li, J., Zhu, H. 2021. Vermicomposting of livestock manure as affected by carbon-rich additives (straw, biochar and nanocarbon): A comprehensive evaluation of earthworm performance, microbial activities, metabolic functions and vermicompost quality. *Bioresource Technology*. 320, 124404.
- Celis, J., Sandoval, M., Barra, R. 2008. Plant response to salmon wastes and sewage sludge used as organic fertilizer on two degraded soils under greenhouse conditions. *Chilean Journal of Agricultural Research* 68:274–283.
- Cheng, C.H., Lehmann, J., Thies, J.E., Burton, S.D., Engelhard, M.H. 2006. Oxidation of black carbon by biotic and abiotic processes. *Org. Geochem.*, 37, 1477–1488.
- Cortés, A., Moreira, M.T., Domínguez, J., Lores, M., Feijoo, G. 2020. Unraveling the environmental impacts of bioactive compounds and organic amendment from grape marc. *Journal of Environmental Management*. 272, 111066.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Dimou, C., Vlysidis, A., Kopsahelis, N., Papanikolaou, S., Koutinas, A. A., Kookos, I.K. 2016. Techno-economic evaluation of wine lees refining for the production of value-added products. *Biochemical Engineering Journal*, 116, 157–165.
- Domínguez, J., Gómez-Brandón, M., 2012. Vermicomposting: composting with earthworms to recycle organic wastes, pp. 29–48. In: Kumar, S., Bharti, A. (Eds.), *Management of Organic Waste*. Intech Open Science, Rijeka, Croacia.
- Domínguez, J., Martínez-Cordeiro, H., Álvarez-Casas, M. Lores M. 2014. Vermicomposting grape marc yields high quality organic biofertiliser and bioactive polyphenols. *Waste Management & Research*. 32(12), 1235-1240.

- Domínguez J, Martínez-Cordeiro, H., Lores M. 2016. Earthworms and grape marc: simultaneous production of a high-quality biofertilizer and bioactive-rich seeds, pp 167–183. In: Morata A, Loira I (Eds). Grape and wine biotechnology. Intech Open Science, Rijeka, Croacia.
- Domínguez, J, Sanchez-Hernandez J.C., Lores M. 2017. Vermicomposting of wine-making products, p. 55–78. In: Galanakis C.M (Ed). Handbook of grape processing by-products: sustainable solutions. London, UK: Academic Press, Elsevier.
- Domínguez, J., Aira, M., Kolbe, A.R., Gómez-Brandón, M., Pérez-Losada, M. 2019. Changes in the composition and function of bacterial communities during vermicomposting may explain beneficial properties of vermicompost. *Scientific Reports*, 9(1).
- Edwards, C. A. 1988. Breakdown of animal, vegetable and industrial organic wastes by earthworm. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 24: 21–31
- Edwards, C.A., Arancon, N.Q. 2022. Interactions Between Earthworms, Microorganisms, and Other Invertebrates. In: *Biology and Ecology of Earthworms*. Springer, New York, NY.
- El-Naggar, A., Lee, S.S., Rinklebe, J., Farooq, M., Song, H., Sarmah, A.K., Zimmerman, A.R., Ahmad, M., Shaheen, S.M., Ok, Y.S. 2019. Biochar application to low fertility soils: A review of current status, and future prospects. *Geoderma*. 337, 536-554.
- Epelde, L., Burges, A., Mijangos, I., Garbisu, C. 2014. Microbial properties and attributes of ecological relevance for soil quality monitoring during a chemical stabilization field study. *Applied Soil Ecology*, 75, 1–12.
- FAO. 2011. Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention. Rome
- FAO. 2019. The State of Food and Agriculture 2019. Moving forward on food loss and waste reduction. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

- Ferraz-Ramos, R., Santana, N., de Andrade, N., Scheffer Romagna, I., Tirloni, B., de Oliveira Silveira, A., Domínguez, J., Josemar Seminoti Jacques, R. 2022. Vermicomposting of cow manure: Effect of time on earthworm biomass and chemical, physical, and biological properties of vermicompost. *Bioresource Technology*, 345, 126572.
- García-Delgado, C., Eymar, E., Camacho-Arévalo, R., Petruccioli, M., Crognale, S., D'Annibale, A. 2018. Degradation of tetracyclines and sulfonamides by stevensite-and biochar-immobilized laccase systems and impact on residual antibiotic activity. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 93(12), 3394-3409.
- García-Sánchez, M., Taušnerová, H., Hanč, A., Tlustoš, P. 2017. Stabilization of different starting materials through vermicomposting in a continuous-feeding system: Changes in chemical and biological parameters. *Waste Management*, 62, 33–42.
- Garg, V.K., Gupta, R. 2011. Effect of Temperature Variations on Vermicomposting of Household Solid Waste and Fecundity of *Eisenia fetida*, *Bioremediation Journal*, 15:3, 165-172.
- Ghosh, S., Goswami, A.J., Ghosh, G.K., Pramanik, P. 2018. Quantifying the relative role of phytase and phosphatase enzymes in phosphorus mineralization during vermicomposting of fibrous tea factory waste. *Ecological Engineering*, 116, 97–103.
- Ginebra, M., Muñoz, C., Calvelo-Pereira, R., Doussoulin, M., Zagal, E. 2022. Biochar impacts on soil chemical properties, greenhouse gas emissions and forage productivity: A field experiment. *Science of the Total Environment*, 806, 150465.
- Gómez-Brandón, M., Lazcano, C., Lores, M., Domínguez, J. 2011. Short-term stabilization of grape marc through earthworms. *Journal of Hazardous Materials*, 187(1-3), 291–295.

- Gómez Brandón, M., Aira, M., Kolbe, A.R., de Andrade, N., Pérez-Losada, M., Domínguez, J. 2019. Rapid Bacterial Community Changes during Vermicomposting of Grape Marc Derived from Red Winemaking. *Microorganisms*, 7(10), 473.
- Gómez-Brandón, M., Aira, M., Santana, N., Pérez-Losada, M., Domínguez, J. 2020. Temporal Dynamics of Bacterial Communities in a Pilot-Scale Vermireactor Fed with Distilled Grape Marc. *Microorganisms*, 8(5), 642.
- Gómez-Brandón, M., Fornasier, F., de Andrade, N., Domínguez, J. 2022. Influence of earthworms on the microbial properties and extracellular enzyme activities during vermicomposting of raw and distilled grape marc. *Journal of Environmental Management*, 319, 115654.
- Gómez-Brandón, M., Lores, M., Domínguez, J. 2023. Recycling and valorization of distilled grape marc through vermicomposting: a pilot-scale study. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 25 (3), 1509-1518
- Grutzmacher, P., Puga, A.P., Bibar, M.P.S., Coscione, A.R., Packer, A.P., de Andrade, C.A. 2018. Carbon stability and mitigation of fertilizer induced N₂O emissions in soil amended with biochar. *Science of the Total Environment*, 625, 1459–1466.
- Hanc, A., Hrebeckova, T., Kuzel, S. 2019. Vermicomposting of Distillery Residues in a Vertical-Flow Windrow System. *Waste and Biomass Valorization*, 10(12), 3647–3657.
- Hao, X., Ma, X., Zeng, B., Zhu, L., Shen, L., Yang, M., Hu, H., Jiang, D., Bai, L. 2021. Efficiency and mechanism of a vermicompost additive in enhancing composting of swine manure. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(46), 65791–65801.
- Hassan, M., Liu, Y., Naidu, R., Parikh, S.J., Du, J., Qi, F., Willett I.R. 2020. Influences of feedstock sources and pyrolysis temperature on the properties of biochar and

functionality as adsorbents: A meta-analysis. *Science of the Total Environment*. 744, 140714.

Hazrati, S., Farahbakhsh, M., Cerdà, A., Heydarpoor G. 2020. Functionalization of ultrasound enhanced sewage sludge-derived biochar: Physicochemical improvement and its effects on soil enzyme activities and heavy metals availability. *Chemosphere*, 269, 128767.

Hinojosa, M.B., García-Ruíz, R., Viñepla, B., Carreira, J. A. 2004. Microbiological rates and enzyme activities as indicators of functionality in soils affected by the Aznalcóllar toxic spill. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(10), 1637-1644.

Hirzel J., y Salazar F.,. 2016. Guía de manejo y buenas prácticas de aplicación de enmiendas orgánicas en agricultura. Boletín INIA. N°325. 56 p. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Chillán, Chile.

Hirzel. J. 2021. Herramientas de manejo nutricional en sistemas sostenibles, p, 370 Céspedes L., Cecilia; Vargas Sch., Sigrid (Eds.). "Agroecología. Fundamentos y técnicas de producción, y experiencia en la Región de los Ríos". Libro INIA N° 45,. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Osorno, Chile

Horn, M.A., Schramm, A., Drake H.L. 2003. The Earthworm Gut: An Ideal Habitat for Ingested N & O-Producing Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(3), 1662 LP – 1669.

Huang, K., Xia, H. 2018. Role of earthworms' mucus in vermicomposting system: biodegradation tests based on humification and microbial activity. *Science of the Total Environment*. 610, 703-708.

Huang, S., Zheng, X., Luo, L., Ni, Y., Yao, L., Ni, W. 2021. Biostimulants in bioconversion compost of organic waste: A novel booster in sustainable agriculture. *Journal of Cleaner Production*, 319, 128704.

Hussain, M., Cholette, S., Castaldi, R.M. 2008. An analysis of globalization forces in the wine industry: implications and recommendations for wineries. *Journal of Global Marketing*. 21 (1), 33-47.

- Jiang, T., Schuchardt, F., Li, G., Guo, R., Zhao, Y. 2011. Effect of C/N ratio, aeration rate and moisture content on ammonia and greenhouse gas emission during the composting. *Journal of Environmental Sciences*, 23(10), 1754–1760.
- Jouni, F., Sanchez-Hernandez, J.C., Brouchoud, C., Capowiez, Y., Rault, M. 2023. Role of soil texture and earthworm casts on the restoration of soil enzyme activities after exposure to an organophosphorus insecticide. *Applied Soil Ecology*, 187, 104840.
- Khatua, C., Sengupta, S., Krishna Balla, V., Kundu, B., Chakraborti, A., Tripathi, S. 2018. Dynamics of organic matter decomposition during vermicomposting of banana stem waste using *Eisenia fetida*. *Waste Management*, 79, 287–295.
- Lehmann, J., Rillig, M.C., Thies, J., Masiello, C.A., Hockaday, W.C., Crowley, D. 2011. Biochar effects on soil biota – A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(9), 1812–1836.
- Lessard, I., Sauvé, S., Deschênes, L. 2014. Toxicity response of a new enzyme-based functional diversity methodology for Zn-contaminated field-collected soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 71, 87–94.
- Li, Y., Yang, X., Gao, W., Qiu, J., Li, Y. 2020. Comparative study of vermicomposting of garden waste and cow dung using *Eisenia fetida*. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(9), 9646–9657.
- Lv, B., Zhang, D., Cui, Y., Yin, F. 2018. Effects of C/N ratio and earthworms on greenhouse gas emissions during vermicomposting of sewage sludge. *Bioresource Technology*, 268, 408–414.
- Malińska, K., Golańska, M., Caceres, R., Rorat, A., Weisser, P., Ślęzak, E. 2017. Biochar amendment for integrated composting and vermicomposting of sewage sludge – The effect of biochar on the activity of *Eisenia fetida* and the obtained vermicompost. *Bioresource Technology*, 225, 206–214.

- Mijangos, I., Albizu, I., Epelde, L., Amezaga, I., Mendarte, S., Garbisu, C. 2010. Effects of liming on soil properties and plant performance of temperate mountainous grasslands. *Journal of Environmental Management*, 91(10), 2066-2074.
- Moore, F., González, M.E., Khan, N., Curaqueo, G., Sanchez-Monedero, M., Rilling, J., Morales, E., Panichini, M., Mutis, A., Jorquera, M., Mejias, J., Hirzel, J., Meier, S. 2018. Copper immobilization by biochar and microbial community abundance in metal-contaminated soils. *Science of the Total Environment*, 616-617, 960–969.
- Muñoz, C., Ginebra, M., Zagal, E. 2019. Variation of Greenhouse Gases Fluxes and Soil Properties with Addition of Biochar from Farm-Wastes in Volcanic and Non-Volcanic Soils. *Sustainability*, 11(7): 1831.
- Nafez, A.H., Nikaeen, M., Kadkhodaie, S., Hatamzadeh, M., Moghim, S. 2015. Sewage sludge composting: quality assessment for agricultural application. *Environmental Monitoring and Assessment* 187:709
- OIV. 2022. Actualidad de la coyuntura del sector vitivinícola mundial en 2021. [en línea]. <<https://www.oiv.int/public/medias/8780/es-state-of-the-world-vine-and-wine-sector-abril-2022.pdf>>. [Consulta: 20 marzo 2023].
- Pérez-Godínez, E.A., Lagunes-Zarate, J., Corona-Hernández, J., Barajas-Aceves, M. 2017. Growth and reproductive potential of *Eisenia foetida* (Sav) on various zoo animal dungs after two methods of pre-composting followed by vermicomposting. *Waste Management*, 64, 67–78.
- Popova, I.E., Deng, S. 2010. A high-throughput microplate assay for simultaneous colorimetric quantification of multiple enzyme activities in soil. *Appl. Soil Ecol.*, 45, 315-318.
- Poveda, J.M., Loarce, L., Alarcón, M., Díaz-Maroto, M.C., Alañón, M.E. 2018. Revalorization of winery by-products as source of natural preservatives obtained

- by means of green extraction techniques. *Industrial Crops and Products*, 112, 617–625.
- Prosser, J.A., Speir, T.W., Stott, D.E. 2011. Soil oxidoreductases and FDA hydrolysis. *Methods of soil enzymology*, 9, 103-124.
- Requejo, M.I., Fernández-Rubín de Celis, M., Martínez-Caro, R., Castellanos, M.T., Ribas, F., Arce, A., Cartagena, M.C. 2016. Winery and distillery derived materials as phosphorus source in calcareous soils. *CATENA*, 141, 30–38.
- Sadzawka, R., Carrasco, M.A., Grez, R., Mora M.L. 2005. Métodos de análisis de compost. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Serie Actas N° 30, Santiago, Chile, 142 p.
- Salehi, B., Vlaisavljevic, S., Adetunji, C.O., Adetunji, J.B., Kregiel, D., Antolak, H., Pawlikowska, E., Uprety, Y., Mileski, K.S., Devkota, H.P., Sharifi-Rad, J., Das, G., Patra, J.K., Jugran, A.K., Segura-Carretero, A., Contreras, M. del M. 2019. Plants of the genus *Vitis*: Phenolic compounds, anticancer properties and clinical relevance. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 362–379.
- Sanchez, W., Burgeot, T., Porcher, J.M. 2012. A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(5), 2721-2725.
- Sanchez-Hernandez, J.C., del Pino, J.N., Domínguez, J. 2015. Earthworm-induced carboxylesterase activity in soil: assessing the potential for detoxification and monitoring organophosphorus pesticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 122, 303-312.
- Sanchez-Hernandez, J.C., Sandoval, M., Pierart, A. 2017. Short-term response of soil enzyme activities in a chlorpyrifos-treated mesocosm: use of enzyme-based indexes. *Ecological Indicators*. 73, 525-535
- Sanchez-Hernandez, J.C. 2018. Biochar activation with exoenzymes induced by earthworms: A novel functional strategy for soil quality promotion. *Journal of Hazardous Materials*. 350, 136-143.

- Sanchez-Hernandez, J.C., Andrade Cares, X., Pérez, M.A., Notario del Pino, J. 2019a. Biochar increases pesticide-detoxifying carboxylesterases along earthworm burrows. *Science of the Total Environment*. 667, 761-768.
- Sanchez-Hernandez, J.C., Ro, K.S., Díaz, F.J. 2019b. Biochar and earthworms working in tandem: Research opportunities for soil bioremediation. *Science of the Total Environment*. 688, 574-583
- Sanchez-Hernandez, J.C., Capowiez, Y., Ro, K.S. 2020. Potential Use of Earthworms to Enhance Decaying of Biodegradable Plastics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 8(11), 4292–4316.
- Sanchez-Monedero, M.A., Cayuela, M.L., Roig, A., Jindo, K., Mondini, C., Bolan, N. 2018. Role of biochar as an additive in organic waste composting. *Bioresource Technology*, 247, 1155–1164.
- Santana, N.A., Jacques, R.J.S., Antonioli, Z.I., Martínez-Cordeiro, H., Domínguez, J. 2020. Changes in the chemical and biological characteristics of grape marc vermicompost during a two-year production period. *Applied Soil Ecology*, 154, 103587.
- Schinner, F., Kandeler, E., Ohlinger, R., Margesin R. 1996. *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York.
- Schramm, A., Davidson, S.K., Dodsworth, J.A., Drake, H.L., Stahl, D.A., Dubilier, N., 2003. Acidovorax-like symbionts in the nephridia of earthworms. *Environ. Microbiol.* 5, 804–809.
- Sharma, K., Garg, V.K. 2018. Comparative analysis of vermicompost quality produced from rice straw and paper waste employing earthworm *Eisenia fetida* (Sav.). *Bioresource Technology*, 250, 708–715.
- Sizmur, T., Fresno, T., Akgül, G., Frost, H., Moreno-Jiménez, E. 2017. Biochar modification to enhance sorption of inorganics from water. *Bioresource Technology*. 246, 34-47.

- Subedi, R., Taupe, N., Pelissetti, S., Petruzzelli, L., Bertora, C., Leahy, J.J., Grignani, C. 2016. Greenhouse gas emissions and soil properties following amendment with manure-derived biochars: Influence of pyrolysis temperature and feedstock type. *Journal of Environmental Management*, 166, 73–83.
- Sun, D., Lan, Y., Xu, E. G., Meng, J., Chen, W. 2016. Biochar as a novel niche for culturing microbial communities in composting. *Waste Management*, 54, 93–100.
- Tiquia, S.M. and N.F.Y. Tam. 1998. Elimination of phytotoxicity during co-composting of spent pig-manure sawdust litter and pig sludge. *Bioresource Technology* 65:43–49.
- Trasar-Cepeda, C., Camiña, F., Leirós, C.M., Gil-Sotres, F. 1999. An improved method to measure catalase activity in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 31, 1-3.
- Triharyanto, E., Damayanti, N. D., Nyoto, S., Muliawati, E.S. 2021. The role of vermicompost and PGPR on growth and formation of bulbils shallot (*Allium cepa* L. *Aggregatum*). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 824(1), 012061.
- Turner, B.L. 2010 Variation in pH optima of hydrolytic enzyme activities in tropical rain forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76 (2010), pp. 6485-6493.
- Unuofin, F.O., Siswana, M., Cishe, E.N. 2016. Enhancing rock phosphate integration rate for fast bio-transformation of cow-dung waste-paper mixtures to organic fertilizer. *Springerplus* 5:1986.
- Vieira, C.E.D., Costa, P.G., Lunardelli, B., de Oliveira, L.F., da Costa Cabrera, L., Risso, W.E., Primel, E.G., Meletti, P.C., Fillmann, G., Bueno dos Reis Martinez, C. 2016. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Science of the Total Environment*, 542, 44–56.

- Villar, I., Alves, D., Pérez-Díaz, D., Mato, S. 2016) Changes in microbial dynamics during vermicomposting of fresh and composted sewage sludge. *Waste Management*, 48, 409–417.
- von Mersi, W., Schinner, F. 1991. An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with idonitrotetrazolium chloride. *Biol. Fert. Soils*, 11, 216-220
- Wang, L., Li, Y., Prasher, S.O., Yan, B., Ou, Y., Cui, H., Cui, Y. 2019. Organic matter, a critical factor to immobilize phosphorus, copper, and zinc during composting under various initial C/N ratios. *Bioresource Technology*, 289, 121745.
- Wu, S., Huijun, H., Inyhapanya, X., Yang, C., Lu, L., Zeng, G., Han, Z. 2017. Role of biochar on composting of organic wastes and remediation of contaminated soils - a review. *Environmental Science and Pollution Research*. 24, 16560-16577.
- Zabaniotou, A., Kamaterou, P., Pavlou, A., Panayiotou, C. 2018. Sustainable bioeconomy transitions: Targeting value capture by integrating pyrolysis in a winery waste biorefinery. *Journal of Cleaner Production*, 172, 3387–3397.
- Zhou, G., Xu, X., Qiu, X., Zhang, J. 2019. Biochar influences the succession of microbial communities and the metabolic functions during rice straw composting with pig manure. *Bioresource Technology*, 272, 10–18.