Cambios químicos, microbiológicos y en resistencia antimicrobiana en lombricompostas de estiércol de cerdo por efecto de la relación carbono:nitrógeno inicial

Sergio Gómez-Rosales[1*] María de Lourdes Angeles[1], Gerardo Mariscal-Landín[1], Luis Humberto López-Hernández[1], Laura Hernández-Andrade[2]

[1]*Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal.*
[2]*Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Km 1 carretera a Colón, Ajuchitlán, Querétaro, México. CP 76280.*

Artículo recibido el 1 de septiembre de 2022 y aceptado el 13 de septiembre de 2022

Chemical, microbiological and antimicrobial resistance changes in vermicomposts of pig manure by the effect of the initial carbon:nitrogen ratio.

Abstract

Vermicomposting is a helpful alternative to recover nutrients and reduce pathogenic bacteria from animal manure; however, the optimal initial carbon: nitrogen ratio (CNR) to maximize the nutritional value and minimize the microbial load and antimicrobial resistance factors (AMR) of the final product is unknown. The objective of the study was to evaluate the effect of the initial CNR (15, 31, 46, and 70) of the pre-composting of vermicompost prepared with swine manure on the changes over time in nutrient content, total aerobic bacteria (TAB), coliforms, fungi and yeasts and AMR factors in *E. coli*. Samples were taken for chemical (days 1, 28, and 140) and microbiological analysis (days 1, 7, 28, 56, 84, and 140), and the presence of AMR (days 1 and 140). Data were analyzed using a mixed model with repeated observations over time and by linear regression analysis. Organic matter, organic carbon, $N\text{-}NH^{4+}$, and CNR decreased and total nitrogen increased with time ($P < 0.01$). TAB, coliform, fungi, and yeast counts showed decreasing cubic responses with time and were comparable at 140 days among vermicompost with different initial CNR ($P < 0.01$). *E. coli* was isolated from 10 initial manure samples; the relative frequency and percentage of *E. coli* isolates with AMR were highest for ampicillin and carbenicillin (7/10, 70%) and intermediate for cephalothin and chloramphenicol (4/10, 40%) and sulfamethoxazole/trimethoprim (3/10, 30%). Five *E. coli* isolates were shown to be multiresistant to antibiotics (MMR). Although no *E. coli* was isolated from the final vermicompost, the bacteria *Acinetobacter anitratus* was found in three (3/12) samples and was also found to be MMR. In conclusion, regardless of the initial CNR, vermicomposts with high nutritional value were obtained, with a lower load of potentially pathogenic bacteria and free of *E. coli* carrying AMR. However, prior to its use as organic fertilizer, the presence of AMR factors in other bacteria should be evaluated to reduce the risks of their spread through soil and water, and of human infections.

Key words: pig manure, vermicomposting, *Escherichia coli*, antimicrobial resistance.

Resumen

El lombricompostaje es una alternativa útil para recuperar nutrientes y reducir las bacterias patógenas del estiércol de los animales; pero, se desconoce la óptima relación carbono: nitrógeno (RCN), inicial, para maximizar el valor nutricional y minimizar la carga microbiana y factores de resistencia antimicrobiana

*Autor de correspondencia
Email: gomez.sergio@inifap.gob.mx
ISSN 2594-0384 (Electrónica)
DOI: https://doi.org.1033154/rlrn.2022.02.02

(RAM), del abono final. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la RCN inicial (15, 31, 46 y 70), del precompostaje de lombricompostas preparadas con estiércol de cerdo sobre los cambios en el tiempo del contenido nutrimental, bacterias aerobias totales (BAT), coliformes, hongos y levaduras, y factores RAM en *E. coli*. Se tomaron muestras para análisis químicos (días 1, 28 y 140), y microbiológicos (días 1, 7, 28, 56, 84 y 140), y presencia de RAM (días 1 y 140). Los datos se analizaron mediante un modelo mixto con observaciones repetidas en el tiempo y mediante análisis de regresión lineal. La materia orgánica, el carbono orgánico, el nitrógeno amoniacal y RCN disminuyeron y el nitrógeno total, aumentó con el tiempo ($P < 0.01$). Los recuentos de BAT, coliformes, hongos y levaduras mostraron respuestas cúbicas decrecientes con el tiempo y fueron similares a los 140 días entre las lombricompostas con diferente RCN inicial ($P < 0.01$). La bacteria *E. coli* se aisló en 10 muestras iniciales de estiércol; la frecuencia relativa y porcentaje de aislados de *E. coli* con RAM fueron mayores para ampicilina y carbenicilina (7/10, 70%), e intermedios para cefalotina y cloranfenicol (4/10, 40%), y sultametoxazol/trimetoprima (3/10, 30%). Cinco aislados de *E. coli* mostraron ser multirresistentes a antibióticos (MMR). Aunque no se aisló *E. coli* de lombricompostas finales, en tres muestras (3/12), se encontró la bacteria *Acinetobacter anitratus*, que también era portadora de AMR. En conclusión, independientemente de la RCN inicial, se obtuvieron lombricompostas con alto valor nutricional, con una menor carga de bacterias patógenas potenciales y libres de *E. coli* portadora de RAM; sin embargo, previo a su uso como abono orgánico, se deben evaluar la presencia de factores RAM en otras bacterias, para reducir los riesgos de su propagación a través del suelo y agua, y de infecciones en humanos.

Palabras claves: estiércol de cerdo, lombricompostaje, *Escherichia coli*, resistencia antimicrobiana.

Introducción

La producción de humus de lombriz a través del lombricompostaje es un proceso de transformación de materia orgánica en un producto de alto valor fertilizante para las plantas y restaurador de suelos de baja fertilidad. Durante el proceso, las lombrices se alimentan de la materia orgánica, y como desecho, eliminan el humus que es parecido a la tierra, de color oscuro, suave, ligero y con un olor a mantillo de bosque (Atiyeh *et al*. 2000; Atiyeh *et al*. 2001). El lombricompostaje es también una alternativa efectiva para reciclar los nutrientes eliminados en las excretas de los animales, reducir la contaminación ambiental y la propagación de bacterias patógenas que ponen en riesgo la salud de los animales y el hombre (Gómez *et al*., 2013).

Previo a la inoculación de las lombrices en el estiércol de animales, se debe mezclar con una fuente de carbono (C), y someter a precompostaje. El precompostaje es necesario en la producción de compostas tradicionales, controlando varios factores para reducir al mínimo la pérdida de nutrientes, principalmente C y nitrógeno (N), por volatilización y asegurar que el material final esté libre de microorganismos patógenos, y se obtenga un producto de alta calidad fertilizante. Para lograr compostas de mayor valor nutrimental, se ha demostrado que se debe mantener condiciones adecuadas de temperatura, pH, humedad, aireación, concentración inicial de C y N, y una óptima relación C: N (RCN). La RCN recomendada al inicio de la precomposta varía de 25:1 a 35:1, ya que los microorganismos encargados de la fermentación requieren entre 25-35 partes de C por una de N para sintetizar proteína y producir energía de manera óptima; una RCN más alta induce a mayores pérdidas de C y una relación más baja provoca mayores pérdidas de N (Bernal *et al*., 2009).

Respecto al lombricompostaje, se desconoce el efecto de las condiciones iniciales de las precompostas sobre la calidad nutrimental del humus y la carga microbiana al final del proceso de lombricompostaje. El estiércol deshidratado y estiércol fresco de cerdo tienen una RCN de 13:1 y 16:1, respectivamente, requiriéndose agregar una fuente vegetal de C para lograr una RCN de 25-35:1 (Gómez *et al*. 2011). De otra manera, se perderá mayor N, el material tenderá a compactarse provocando condiciones de anaerobiosis, fermentaciones indeseables y riesgo de proliferación de microorganismos patógenos. Estas condiciones son también adversas para el trabajo de las lombrices ya que no pueden deslizarse adecuadamente en materiales compactados, pueden morir por insuficiente oxigenación y por los gases emitidos.

Se ha documentado que los cerdos adicionados con antibióticos promotores del crecimiento en el alimento pueden eliminar en el estiércol diversas bacterias patógenas, y dentro de éstas, algunas portadoras de genes de resistencia antimicrobiana (RAM) (Cao *et al*., 2020; Congilosi *et al*., 2021), y contribuir a la expansión de estos genes en el ambiente, como suelos después de la aplicación del estiércol (Marti *et al*., 2013; Smith *et al*., 2019). Estos microcontaminantes pueden representar un riesgo para la salud humana, animal y vegetal (Kyakuwaire *et al*., 2019; Congilosi *et al*., 2021). En estudios previos se ha observado que las lombrices de tierra pueden disminuir significativamente los conteos de diferentes bacterias potencialmente patógenas como enterococos fecales, coliformes fecales y *Escherichia coli* en estiércol de vaca, lodos y diferentes mezclas de biosólidos a nivel de laboratorio e industrial (Contreras-Ramos *et al*., 2005; Rodríguez-Canché *et al*., 2010; Aira *et al*., 2011). También en una investigación de lombricomposteo usando larvas de mosca doméstica se encontró disminución de la abundancia de ciertos genes marcadores de RAM durante un período de tan solo seis días (Wang *et al*., 2015). En la literatura consultada no se encontró información acerca del efecto del lombricompostaje de estiércol de cerdo sobre la presencia de factores de RAM al principio y final del proceso. Por lo anterior, el objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la RCN al inicio del precompostaje de lombricompostas preparadas con estiércol de cerdo, sobre los cambios en el tiempo en el contenido nutrimental, conteo de bacterias aerobias totales (BAT), coliformes totales, hongos y levaduras, y la presencia de factores de RAM en *E. coli*.

Materiales y Métodos

Preparación de lombricompostas

El estiércol de cerdo utilizado en el estudio se recogió del estercolero de una granja de cerdos de ciclo completo localizada en el CENID Fisiología y Mejoramiento Animal del INIFAP, localizado en Ajuchitlán, Querétaro. El estiércol sólido de cerdos de diferentes edades se retira diariamente con pala de los corrales. Antes del inicio del estudio el estiércol fue homogéneamente mezclado. Para elaborar las precompostas y obtener cuatro diferentes RCN, el estiércol se mezcló con rastrojo de maíz y agua en diferentes cantidades como se muestra en la cuadro 1. Las cuatro fórmulas de RCN mostradas en la cuadro 1 se obtuvieron de los análisis de C orgánico (C Org), y N de muestras de las precompostas tomadas en el primer día del proceso; las cuatro RCN al inicio fueron: 15:1, 31:1, 46:1 y 70:1.

Las precompostas de 50 kg se tuvieron dentro de un invernadero con piso de concreto y techo de plástico para controlar las condiciones de fermentación y humedad. Se colocó un plástico negro en el piso de concreto antes de colocar la mezcla y el montón se cubrió con el mismo plástico durante la fase termófila para reducir las pérdidas de calor, materia orgánica (MO), y agua. Las precompostas se mantuvieron cubiertas con plástico durante 28 días. Las precompostas fueron volteadas cada semana y al mismo tiempo se añadió agua para mantener una humedad adecuada de la mezcla. A los 28 días, se retiró la cubierta de plástico de las precompostas y se añadió agua cada dos semanas para hidratar la mezcla. También a los 28 días se inocularon con un pie de cría de lombriz roja californiana.

Cuadro 1. Cantidades de estiércol, rastrojo de maíz y agua mezclados para preparar las precompostas.

RCN*	Estiércol, kg	Rastrojo, kg	Agua, L	Total
15:1	15	10	25	50
31:1	15	15	20	50
46:1	10	20	20	50
70:1	10	25	15	50

*Obtenidas al inicio del proceso mediante análisis de carbono y nitrógeno.

Muestreo y determinaciones de laboratorio

Las temperaturas de las precompostas fueron registradas cada dos días con un termómetro de carátula. Se tomaron muestras de las precompostas los días 1 y 28 y de lombricompostas el día 140 para llevar a cabo análisis químico. En el laboratorio, las muestras para análisis químico fueron liofilizadas y molidas con malla de 2 mm. Se realizaron determinaciones de materia seca (MS), cenizas, N total (NT), y N amoniacal ($N–NH^{4+}$), siguiendo procedimientos de rutina. Para obtener el contenido de MO, el contenido de cenizas se restó del contenido de MS. La MO se dividió entre 1.8 para estimar la cantidad de C Org. Para estimar la RCN inicial y a través del tiempo, el C Org se dividió entre el NT.

También se tomaron muestras para análisis microbiológico los días 1, 7, 28, 56, 84 y 140 del estudio, utilizando bolsas de plástico estériles. Las bacterias aerobias totales (BAT), se determinaron mediante el método de recuento estándar en placa, utilizando el agar de recuento estándar Bioxon (BX-211724, BD-BioxonTM, Becton Dickinson de México). Para esto, se homogeneizó 1 g de muestra en 9 mL de solución salina isotónica (SSI, 0.9% NaCl). Se prepararon diluciones decimales hasta 10^{-6} en SSI a 40 °C, y se agitaron orbitalmente. Las placas se dejaron solidificar durante 10 min y se invirtieron mediante incubación (Modelo Max Q4450, Thermo Scientific, Ciudad de México, México), a 37 °C durante 24 h. Los conteos de coliformes totales se realizaron sembrando diluciones en series de 10 en placas de agar triptosa, incubando durante 24 h, en condiciones aeróbicas. La determinación de hongos totales y levaduras se realizó mediante la técnica de extensión selectiva en placa de agar. Una muestra de 1 g se homogeneizó en SSI durante 1 min y se realizaron diluciones decimales de 10^{-2} a 10^{-6} en tubos de ensayo con 9 mL de SSI. Se usó agar glucosa Sabouraud con cloranfenicol y se incubaron a 37 ^{o}C durante 48 h. Los resultados de microbiología se expresaron en unidades formadoras de colonias por gramo demuestra (UFC/g).

Al inicio del estudio, se tomaron muestras de estiércol del estercolero en dos diferentes días, las cuales se dividieron en grupos de cinco para análisis de RAM. El total de muestras iniciales analizadas fue de 10. También se tomó una muestra a los 140 días después de iniciado el proceso de lombricompostaje para analizar la presencia de RAM. Se seleccionó la bacteria *E. coli* para evaluar la presencia de RAM a diferentes agentes antimicrobianos mediante la técnica de Kirby Bauer (Bauer *et al*., 1966). Para esto, se usaron discos impregnados con los siguientes antibióticos: ampicilina, carbenicilina, cefalotina, cefotaxima, ciprofloxacina, cloranfenicol, nitrofurantoína, amikacina, gentamicina, netilmicina, norfloxacina, sulfametoxazol y trimetoprima (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States). Los cultivos se ajustaron al tubo 0.5 de la escala de McFarland y con un hisopo fueron sembrados en agar Mueller-Hinton. Posteriormente, se colocaron discos comerciales con los antibióticos a analizar y las placas se incubaron por 24 h. Al finalizar la incubación, se midieron las zonas de inhibición clasificando a las bacterias como sensibles, intermedias y resistentes a los antimicrobianos utilizados, de acuerdo al Clinical and Laboratory Standars Institute. Se utilizó como control *E. coli* ATCC 35218.

Para analizar el contenido nutrimental y los cambios microbiológicos, los datos fueron sometidos a un ANOVA usando un modelo mixto con observaciones repetidas en el tiempo, usando como efecto fijo la RCN y los efectos aleatorios el día de muestreo, y su interacción con la RCN. Además, se llevaron a cabo análisis de regresión para describir la respuesta de las variables a través del tiempo.

Resultados

Cambios de temperaturas

Las temperaturas registradas durante los primeros 28 días se presentan en la figura 1. A los tres días de iniciado el precompostaje se alcanzaron temperaturas mayores de 40 ^{o}C en todos los tratamientos. A los tres días, la temperatura más alta se alcanzó con RCN de 15 (56.17 ^{o}C), pero las temperaturas por arriba de 40 ^{o}C en este tratamiento solo se mantuvieron hasta el día 13 del precompostaje. Para los tratamientos con RCN de 31 y 46, las temperaturas a los tres días del precompostaje fueron similares (47.83 y 47.67 ^{o}C), pero las temperaturas por arriba de 40 ^{o}C se mantuvieron hasta el día 27 con RCN de 31 y hasta el día 23 con RCN de 46. Las precompostas con RCN de 70, tuvieron las temperaturas más bajas a los tres días del precompostaje (41.67 ^{o}C), y tuvieron temperaturas por arriba de 40 ^{o}C hasta el día 11 del proceso.

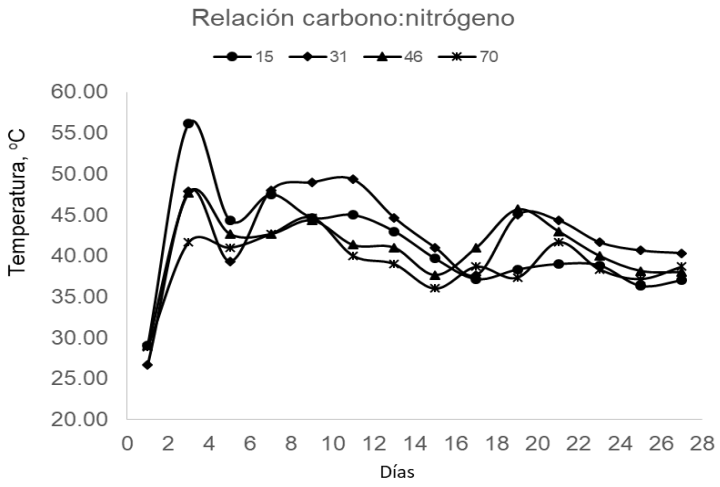


Figura 1. Temperaturas de las precompostas durante los primeros 28 días del proceso.

Cambios de composición química

En el cuadro 2 se presentan los cambios en el contenido de MO, C Org, NT, N–NH^{4+} y RCN. Los contenidos de MO y C Org fueron mayores en las precompostas al día 1, y disminuyeron en los días 28 y 140; también se observó que, dentro de cada día, la MO y C Org mostraron incrementos lineales respecto a la RCN inicial (interacción de RCN inicial y día de muestreo, $P < 0.01$). El contenido de N-NH^{4+} también disminuyó a través del tiempo; respecto a la RCN inicial, el N-NH^{4+} mostró una disminución lineal, pero en los días 28 y 140, no se vio afectado por la RCN (interacción de RCN inicial y día de muestreo, $P < 0.01$). El contenido de NT aumentó con el tiempo y se observaron diferencias debido a la RCN dentro de cada día de muestreo (Interacción de RCN inicial y día de muestreo, $P < 0.01$). El NT en los días 1 y 28 mostró un patrón lineal decreciente con relación a la RCN inicial, pero en el día 140 el NT fue mayor para RCN de 15 y 46, intermedio en 70 y menor en 31. La RCN al día 28 aumentó respecto al aumento de la RCN inicial, pero en el día 140 no se encontraron diferencias con respecto a la RCN inicial.

Cambios microbiológicos

En el cuadro 3 se presentan los cambios microbiológicos a través del tiempo. Los conteos de BAT, coliformes, hongos y levaduras mostraron un patrón de tipo cúbico a través del tiempo ($P < 0.01$), registrándose los valores más altos y los más bajos los días 7 y 140, respectivamente; además, en cada una de estas variables hubo interacción entre el día de muestreo y la RCN ($P < 0.05$). Las BAT fueron diferentes entre tratamientos con diferente RCN solamente en los días 1 y 7, mientras que en los días 28, 56, 84 y 140 del lombricompostaje, los conteos de BAT fueron similares. Los coliformes mostraron diferencias entre tratamientos los días 1, 7 y 28, pero fueron similares a los 56, 84 y 140 días, independientemente de la RCN inicial. Los hongos tuvieron diferencias entre tratamientos los días 1, 28, 56 y 84, pero fueron similares los días 7 y 140. Las levaduras mostraron diferencias entre tratamientos los días 1, 28 y 56 pero el resto de los días de muestreo fueron similares.

Cambios en la resistencia antimicrobiana

En el cuadro 4 se presentan los cambios en la resistencia antimicrobiana. En las 10 muestras de heces tomadas al inicio del estudio se aisló *E. coli*. La frecuencia relativa y porcentaje de aislados de *E. coli* resistentes a antimicrobianos fueron mayores para la ampicilina y carbenicilina (7/10, 70%), intermedios para cefalotina y cloranfenicol (4/10, 40%), y sultametoxacina/trimetoprima (3/10, 30%), y los valores más bajos fueron para ciprofloxacina (2/10, 20%), y norfloxacina, amikacina y gentamicina (10%). Solamente hubo sensibilidad total de *E. coli* a los antimicrobianos cefotaxima, netilmicina y nitrofurantoina. Respecto a los

Cuadro 2. Medias de mínimos cuadrados de la interacción de la relación carbono:nitrógeno inicial y día del muestreo en los cambios químicos de las precompostas y lombricompostas.

	Relación carbono:nitrógeno inicial				
	15	31	46	70	EEM*
Días	Materia orgánica, %				
1	73.40[a]	81.39[b]	85.26[c]	88.79[d]	1.267
28	66.55[e]	65.58[e]	76.17[f]	79.23[f]	
140	55.68[g]	59.18[h]	54.08[g]	63.28[e]	
	Carbono orgánico, %				
1	40.78[a]	45.22[b]	47.36[c]	49.33[d]	0.704
28	36.97[e]	36.43[e]	42.32[a]	44.02[b]	
140	30.94[f]	32.88[g]	30.05[f]	35.15[h]	
	Nitrógeno total, %				
1	2.69[a]	1.50[b]	1.05[c]	0.71[d]	0.133
28	3.40[e]	3.17[eh]	2.38[a]	1.94[f]	
140	3.13[eh]	2.59[a]	3.04[h]	2.81[h]	
	Nitrógeno amoniacal, mg/kg				
1	568.17[a]	235.97[b]	240.58[b]	180.6[c]	21.664
28	77.34[d]	88.32[d]	87.45[d]	82.61[d]	
140	42.62[d]	46.58[d]	40.87[d]	43.5[d]	
	Relación carbono:nitrógeno				
1	15.22[ae]	31.01[b]	45.95[c]	70.43[d]	2.566
28	10.90[a]	11.55[a]	18.24[e]	22.80[e]	
140	9.90[a]	12.83[a]	9.93[a]	12.51[a]	

* EEM = Error estándar de la media.
[a-h] Efecto de la interacción de la RCN inicial y día de muestreo, $P < 0.01$.

aislados de *E. coli* realizados al final de la prueba, todas las muestras fueron negativas a la presencia de *E. coli*. Pero en tres muestras colectadas (dos muestras con RCN de 15 y una muestra con RCN de 70), se aisló la bacteria Gram negativa *Acinetobacter anitratus*. En las pruebas de RAM se encontró alta resistencia de *A. anitratus* a ampicilina, carbenicilina, cefalotina, cloranfenicol y nitrofurantoína y resistencia intermedia a cefotaxima; la bacteria fue sensible al resto de los antibióticos evaluados.

Discusión

La temperatura de las precompostas durante la fase termofílica varió entre los diferentes tratamientos. La temperatura óptima recomendada durante el precompostaje para la descomposición de la materia orgánica es de 40–65 ^{o}C (de Bertoldi *et al*., 1983; Bernal *et al*., 2009). En el presente estudio, durante los tres primeros días del proceso todas las precompostas alcanzaron temperaturas mayores a los 40 ^{o}C; sin embargo, la RCN inicial afectó considerablemente el período durante el cual las temperaturas se mantuvieron por arriba de los 40 ^{o}C, ya que los períodos fueron menores con RCN de 70 (11 días), y 15 (13 días), y fueron más prolongados con RCN de 46 y 31 (23 y 27 días).

En las precompostas con RCN de 70, se agregó mayor cantidad de rastrojo de maíz respecto al estiércol de cerdo (Tabla 1), lo que probablemente aumentó la porosidad de la mezcla y motivó mayores pérdidas de calor; mientras que en las precompostas con RCN de 15 se agregó mayor

Cuadro 3. Medias de mínimos cuadrados de la interacción de la relación carbono:nitrógeno inicial y día del muestreo en los cambios microbiológicos de las precompostas y lombricompostas.

	Relación carbono:nitrógeno inicial				
	15	31	46	70	EEM*
Días	Bacterias aerobias totales, $UFC_{(\log 10)}/g$				
1	8.42^{ac}	9.69^{b}	8.54^{ac}	8.37^{ac}	0.322
7	9.44^{b}	8.59^{a}	10.00^{b}	10.29^{b}	
28	8.63^{ab}	9.08^{ab}	9.24^{ab}	8.67^{ab}	
56	6.73^{cd}	6.92^{cd}	7.72^{ac}	7.13^{c}	
84	6.08^{d}	6.17^{d}	6.04^{d}	5.72^{d}	
140	5.89^{d}	6.25^{d}	6.16^{d}	6.34^{d}	
	Coliformes, $UFC_{(\log 10)}/g$				
1	8.08^{a}	8.31^{a}	8.62^{a}	7.68^{a}	0.373
7	7.70^{a}	7.96^{a}	9.13^{b}	9.14^{b}	
28	6.54^{c}	6.56^{c}	7.60^{a}	8.13^{a}	
56	5.16^{de}	5.73^{d}	5.55^{d}	5.31^{d}	
84	4.32^{e}	4.32^{e}	4.47^{e}	4.42^{e}	
140	4.90^{e}	4.94^{e}	3.99^{e}	4.26^{e}	
	Hongos, $UFC_{(\log 10)}/g$				
1	7.91^{a}	7.00^{ab}	6.42^{b}	6.34^{b}	0.502
7	6.45^{b}	6.28^{b}	6.24^{b}	6.49^{b}	
28	4.39^{c}	4.77^{c}	6.49^{b}	6.05^{b}	
56	4.93^{c}	4.85^{c}	5.79^{bc}	6.30^{b}	
84	3.74^{c}	4.32^{c}	5.37^{c}	4.66^{c}	
140	3.72^{c}	3.75^{c}	4.19^{c}	3.83^{c}	
	Levaduras, $UFC_{(\log 10)}/g$				
1	8.40^{a}	10.34^{b}	5.13^{cd}	5.07^{cd}	0.301
7	5.10^{cd}	5.42^{cd}	5.60^{cd}	5.45^{cd}	
28	4.75^{de}	5.43^{cd}	5.55^{c}	5.73^{c}	
56	3.71^{ef}	4.31^{e}	3.22^{f}	3.63^{ef}	
84	5.44^{c}	5.46^{c}	5.81^{c}	5.38^{cd}	
140	4.47^{de}	4.55^{de}	4.69^{de}	4.45^{de}	

* EEM = Error estándar de la media.

[a-e] Efecto de la interacción de la RCN inicial y día de muestreo, $P < 0.01$.

Cuadro 4. Frecuencia relativa y porcentaje de aislados de *Escherichia coli* resistentes a antimicrobianos en estiércol de cerdo al inicio del estudio*.

	Frecuencia Relativa	Porcentaje
Ampicilina	7/10	70
Carbenicilina	7/10	70
Cefalotina	4/10	40
Cloranfenicol	4/10	40
Sulfametoxasol/ trimetoprima	3/10	30
Ciproflacina	2/10	20
Norfloxacina	1/10	10
Amikacina	1/10	10
Gentamicina	1/10	10
Cefotaxima	0/10	0
Netimicina	0/10	0
Nitrofurantorina	0/10	0

* Se tomaron cinco muestras de estiércol del estercolero en dos diferentes días, y en total se usaron 10 muestras para análisis de RAM.

cantidad de estiércol de cerdo respecto al rastrojo de maíz, lo que probablemente redujo la porosidad y aireación provocando compactación de la mezcla y condiciones de anaerobiosis lo que también redujo la producción de calor de los microorganismos descomponedores (Finstein y Miller, 1985; Bernal *et al*., 2009). En las precompostas con RCN de 46 la cantidad de rastrojo también fue mayor comparada con la cantidad de estiércol, lo que probablemente también aumentó la porosidad de la mezcla, pero fue suficiente para mantener temperaturas por arriba de los 40 ^{o}C hasta los 23 días. En cambio, en las precompostas con RCN de 31 la cantidad de estiércol fue igual a la cantidad de rastrojo en la mezcla, lo que permitió que la RCN se mantuviera dentro del rango óptimo, de 25:1 a 35:1, para los microorganismos encargados de la fermentación de la MO (Bernal *et al*., 2009), lo que probablemente provocó que las temperaturas termofílicas se mantuvieran hasta los 27 días del proceso.

Las reducciones en el contenido de C Org y RCN y los aumentos en el contenido de NT a través del tiempo del lombricompostaje coinciden con reportes previos en los que se hicieron lombricompostas con estiércol de cerdo (Aira *et al.*, 2007; Bernal *et al.*, 2009) y de vaca (Mupondi *et al.*, 2010; Saba *et al.*, 2019). Normalmente la relación RCN disminuye durante el compostaje debido a la degradación de la MO, con la liberación de CO_2, y el aumento en la concentración de NT (Bernal *et al*., 1996). Al final del estudio, la RCN, así como el N-NH^{4+}, se encontraron dentro del rango recomendado para compostas estables. Los valores de N-NH^{4+} esperados en compostas inmaduras, maduras y muy maduras son de >500, 75-500 y <75 mg/kg de MS (TMECC, 2002). Desde el principio, las precompostas con RCN de 15 fueron inmaduras (N-NH^{4+} = 568.17), debido a su mayor contenido de estiércol de cerdo con respecto al rastrojo de maíz comparadas con el resto de las precompostas. Pero al final, todas las lombricompostas tuvieron un contenido de N-NH^{4+} <75 mg/kg de MS, por lo que se consideran muy maduras. En cuanto a la RCN, se han sugerido valores <20, <16 y <12 para compostas maduras (Bernal *et al*., 2009). Los valores finales de RCN en el presente trabajo fueron de 9.90 a 12.83, por lo que se consideran compostas muy maduras.

Las lombricompostas contienen una gran cantidad, diversidad y actividad de microbios (Subler *et al*., 1998), y contienen enzimas microbianas como proteasas, amilasas, lipasas, celulasas y quitinasas que continúan la desintegración de la MO. El aumento significativo de la diversidad y la actividad microbiana de las lombricompostas usadas como abonos orgánicos en suelos de cultivo son fuente de

reguladores del crecimiento vegetal producidos por interacciones entre microorganismos, lo que podría contribuir significativamente a aumentar el crecimiento, la floración y el rendimiento de las plantas (Arancon *et al*., 2006).

Los resultados del presente estudio indican que las BAT, coliformes, hongos y levaduras se redujeron sensiblemente, independientemente de la RCN inicial de las precompostas, durante el proceso de lombricompostaje. Los conteos de BAT y coliformes aumentaron sensiblemente a los 7 días del proceso, y posteriormente se redujeron de manera lineal, lo que originó la respuesta de tipo cúbica a través del tiempo. El aumento inicial de microorganismos se debe a la provisión del sustrato a la temperatura y humedad idóneas que estimulan una rápida proliferación de bacterias, pero posteriormente la proliferación se reduce debido a que se alcanzan temperaturas termofílicas. Durante los días 1, 7 y 28 se presentaron las principales diferencias en los conteos de BAT y coliformes, pero no se observaron tendencias claras en cuanto a la predominancia de algún microbio particular respecto a la RCN inicial. Así mismo, la falta de diferencias en los conteos de BAT y coliformes a partir de los 28 y 56 días de muestreo en las lombricompostas con diferente RCN, sugiere que la acción de las lombrices a través del tiempo fue más importante que la composición de las precompostas al inicio del proceso. Algunas publicaciones previas coinciden con los resultados del presente trabajo. En un estudio se reportó reducciones de hasta 98% en las poblaciones de coliformes en excretas de cerdo después de ser sometidas a lombricomposteo, lo que se relacionó a la acción de las enzimas digestivas y microflora residentes en el intestino de las lombrices (Monroy *et al*., 2009). Así mismo, en lombricompostas preparadas con estiércol de ganado se observaron reducciones en los conteos de coliformes fecales y *E. coli* (Aira *et al*., 2011). Al final del presente estudio, los coliformes se redujeron en 39, 41, 54 y 44% en los tratamientos con RCN inicial de 15, 31, 46 y 70, respectivamente.

Durante el compostaje, los hongos están presentes a través de todo el proceso y en la fase de maduración son capaces de degradar polímeros resistes (Bernal *et al*., 2009). En el presente estudio, a diferencia de los otros microorganismos evaluados, los hongos presentaron una caída lineal desde el día 1 al 140 del proceso. Hubo diferencias en los conteos de hongos en los días 1, 28, 56 y 84; dentro de las diferencias más marcadas se encontró que los hongos en las precompostas con RCN inicial de 15 fueron mayores en el día 1, pero fueron menores en los días 28, 56 y 84, con respecto al resto de los tratamientos. Probablemente, los mayores conteos de hongos al principio se debieron a la mayor cantidad de estiércol de cerdo en esta precomposta, y en los días posteriores, los menores conteos de hongos se debieron al menor contenido de polímeros resistentes, debido a la menor concentración de rastrojo de maíz que aporta los polímeros necesarios para el crecimiento de estos microbios (Bernal *et al*., 2009). Al día 140, los conteos de hongos fueron similares entre tratamientos, lo que podría indicar que en todas las lombricompostas se empezaron a agotar los polímeros resistentes, pero se mantuvo una cantidad basal de microorganismos. Del día 1 al 140, los hongos se redujeron en 54, 46, 35 y 40% en los tratamientos con RCN inicial de 15, 31, 46 y 70, respectivamente.

Las levaduras pertenecen al grupo de los hongos y normalmente se analizan y se reportan juntos, los hongos y levaduras, o se reportan solo los hongos totales (Nakasaki *et al*., 2017; Saba *et al*., 2019). La caída en los conteos de las levaduras a través del tiempo, fue, por lo tanto, similar a la caída en los conteos de los hongos. En otros reportes también se han observado disminuciones en los conteos de levaduras a través del tiempo (Nakasaki *et al*., 2017; Saba *et at*., 2019). Las diferencias iniciales en los conteos de levaduras, probablemente se debieron a la mayor cantidad de estiércol de cerdo en las precomposta con RCN inicial de 15 y 31, como se discutió en los hongos. Las diferencias observadas en días posteriores no indicaron una tendencia clara respecto a la RCN inicial.

Todas las muestras de estiércol colectadas al inicio resultaron positivas en el aislamiento de *E. coli*, como se esperaba. Esta bacteria proveniente del aparato digestivo de los cerdos se considera comensal ya que tiene diversas funciones que benefician al organismo; sin embargo, en situaciones de estrés de los animales o cambios en el ambiente luminal intestinal, algunos serotipos de *E. coli* pueden volverse patógenas, causando infecciones en los animales (Rentería *et al*., 2021). Además, se considera que *E. coli* es un indicador de la propagación de genes RAM en el ambiente (Poirel *et al*., 2018; Pisseti *et al*., 2021). La

combinación de la presencia de serotipos de *E. coli* patógena y genes RAM en el ambiente se considera un riesgo de salud para los animales y las personas.

Los aislados de *E. coli* mostraron resistencia alta a los antibióticos betalactámicos, derivados de la penicilina, que ejercen su acción en la pared celular de las bacterias. La resistencia intermedia se observó en la cefalotina derivada de las cefalosporinas que también ejercen su efecto en la pared celular; también en el cloranfenicol, derivado de los fenicoles, que inhiben la síntesis de proteínas en los ribosomas, y la combinación de sultametoxazina/trimetoprima, derivados de las sulfonamidas y trimetoxibenzilpirimidina, respectivamente, que bloquean dos etapas consecutivas en la biosíntesis de purinas y por tanto, de ácidos nucleicos esenciales para muchas bacterias. La resistencia baja se presentó en dos derivados de las fluoroquinolonas, ciprofloxacina y norfloxacina, que inhiben la síntesis del ADN, y dos derivados de los aminoglucósidos, amikacina y gentamicina que también inhiben la síntesis de proteínas en los ribosomas. Estos resultados indican que los aislados de *E. coli* presentan genes RAM que inhiben el efecto de los antibióticos que ejercen su mecanismo de acción en la pared celular, la síntesis de proteína, la síntesis de ácidos nucleicos y la síntesis de ADN en las bacterias. Siete de los antibióticos en los que hubo algún grado de resistencia son específicos para bacterias Gram negativas como *E. coli*, y dos son de amplio espectro. Algunos antibióticos en los que se observó algún grado de resistencia son naturales y otros son sintéticos, incluyendo dos fluoroquinolonas de segunda generación. Cinco aislados de *E. coli* fueron resistentes a tres o más antibióticos clasificándose como microorganismos multirresistentes (MMR). Los resultados coinciden con reportes previos (Poirel *et al*., 2018; Zhou *et al*., 2019; Pisseti *et al*., 2021).

Al final del proceso de lombricompostaje, dentro de los coliformes encontrados, no se aisló *E. coli* en ninguna de las muestras, lo que sugiere que independientemente de la RCN inicial, la acción de las lombrices fue más importante para eliminar esta bacteria potencialmente patógena. Anteriormente se había reportado que el lombricomposteo puede reducir los niveles de diferentes patógenos tales como, coliformes totales y fecales, *E. coli*, *Salmonella*, *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter cloacae*, huevos de helmintos y virus humanos en diferentes tipos de residuos (Parthasarathi *et al*., 2007; Monroy *et al*., 2009; Edwards y Subler, 2011; Atanda *et al*., 2018). Estos resultados se han relacionado a una combinación de las habilidades digestivas de las lombrices, que incluyen la molienda fina de células bacterianas, la acción de las enzimas digestivas y microflora residentes en el intestino de las lombrices (Monroy *et al*., 2008; Monroy *et al*., 2009; Edwards y Subler, 2011). Se ha sugerido que las lombrices devoran todos los patógenos (bacterias, hongos, protozoarios y nematodos), encontrados en las aguas residuales y los lodos ya que es su alimento preferido (Sinha *et al*., 2010). También secretan un fluido celómico que posee propiedades anti-bacterianas e inhibe la formación de bacterias causantes de la putrefacción. Algunas bacterias y hongos que se benefician de las lombrices también producen antibióticos que matan a los microorganismos patógenos en la biomasa de los residuos haciendo el medio virtualmente estéril y sin olor (Vanotti *et al*., 2005; Sinha y Herat, 2010). Por ejemplo, el hongo *Penicillium* spp., ha sido encontrado en el intestino de las lombrices (Sinha *et al*., 2008).

Pero en tres muestras colectadas (dos muestras con RCN de 15 y una muestra con RCN de 70), se aisló la bacteria Gram negativa *Acinetobacter anitratus*. Las bacterias del género *Acinetobacter* son omnipresentes y se encuentran de forma natural en los suelos, el agua y los animales; en consecuencia, los alimentos y el agua pueden contaminarse con frecuencia y la exposición humana conlleva el riesgo de infección (Kämpfer, 2014; Percival y Williams, 2014). Dado que esta bacteria no se detectó en las muestras iniciales de estiércol o precompostas, probablemente la contaminación de las lombricompostas se originó del agua u otras fuentes como polvos que acarrean bacterias a través del aire. *Acinetobacter* se clasifica generalmente como patógeno primario de bajo grado o patógenos oportunistas y son patógenos extremadamente importantes en el ámbito hospitalario, donde a menudo presentan resistencia múltiple a los antibióticos (Kämpfer, 2014; Percival y Williams, 2014).

En pruebas de RAM, se ha reportado (Percival y Williams, 2014), que todas las cepas de *Acinetobacter* han mostrado resistencia a penicilina, ampicilina, cefalosporinas de primera generación y cloranfenicol, mientras que a carbenicilina, tetraciclinas (especialmente la minociclina

oxitetraciclina y clortetraciclina), y aminoglucósidos, parecen haber sido eficaces para eliminar estas bacterias. Estos hallazgos concuerdan parcialmente con los resultados del presente trabajo ya que *A. anitratus* fue resistente a la ampicilina y cefalotina que es una cefalosporina de primera generación, y al cloranfenicol; además *A. anitratus* fue resistente a nitrofurantoína y carbenicilina, que pertenece a un subgrupo de penicilinas. También hubo resistencia intermedia a cefotaxima; pero la bacteria fue sensible al resto de los antibióticos evaluados. Sin embargo, debido a que *A. anitratus* mostró resistencia a más de tres antibióticos se considera MMR. En investigaciones subsecuentes se deben identificar la fuente o fuentes ambientales de esta bacteria para evitar riesgos de infecciones en el personal que maneja los abonos orgánicos finales, y evitar su diseminación en los suelos agrícolas y aguas de riego.

Conclusiones

La RCN inicial de las precompostas no influyó en la calidad final de las lombricompostas debido a que el $N\text{-}NH^{4+}$, NT y RCN fueron similares al día 140, a excepción de las lombricompostas con RCN de 31 que tuvieron menor contenido de NT; también, la RCN inicial no afectó la microbiología final de las lombricompostas debido a que se observaron conteos similares en las BAT, coliformes, hongos y levaduras. Durante el proceso de lombricomposteo, se eliminó la presencia de *E. coli* y factores RAM detectadas en el estiércol inicial, independientemente de la RCN inicial. Esto indica que en precompostas dirigidas a producción de lombricompostas de pueden usar RCN desde 15 hasta 70, sin que se afecte negativamente la calidad fertilizante del producto final. Sin embargo, se deben evaluar la presencia de factores RAM en diferentes bacterias, además de coliformes como *E. coli*, previo a su uso como abono orgánico, para reducir los riesgos de su propagación a través del suelo y agua y de infecciones en humanos.

Agradecimientos

El experimento se llevó a cabo con fondos fiscales del INIFAP a través del proyecto: Mitigación del impacto climático de la producción porcina a través de estrategias alimenticias y de manejo. No. SIGI: 13202534765.

Referencias

Aira, M.; Monroy, F.; Domínguez, J. Eisenia fetida (Oligochaeta: Lumbricidae) modifies the structure and physiological capabilities of microbial communities improving carbon mineralization duringvermicomposting of pig manure. Microbial Ecology, 2007, 54, 662–671. https://doi.org/10.1007/s00248-007- 9223-4

Aira, M., Gómez-Brandón, M., González-Porto, P. and Domínguez, J., 2011. Selective reduction of the pathogenic load of cow manure in an industrial-scale continuous-feeding vermireactor. Bioresource Technology 102: 9633–9637. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.115

Arancon, N.Q., Edwards, C.A., Lee, S. and Byrne, R., 2006. Effects of humic acids from vermicomposts on plant growth. Eurasian Journal of Soil Biology 42: S65-S69. https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2006.06.004

Atanda, A.C., Adeleke, R.A., Jooste, P.J. and Madoroba, E., 2018. Insights into the Microbiological Safety of Vermicompost and Vermicompost Tea Produced by South African Smallholder Farmers. Indian Journal of Microbiology 58: 479–488. https://doi.org/10.1007/s12088-018-0748-7

Atiyeh, R.M., Arancon, N., Edwards, C.A. and Metzger, J.D., 2000. Influence of earthworm-processed pig manure on the growth and yield of greenhouse tomatoes. Bioresource Technology 75: 175-180. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00064-X

Atiyeh, R.M., Edwards, C.A., Subler, S. and Metzger, J.D., 2001. Pig manure vermicompost as a component of a horticultural bedding plant medium: effects on physicochemical properties and plant growth. Bioresource Technology 78: 11-20. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00172-3

Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. and Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. American Journal of Clinical Pathology 45: 493–496. https://doi:10.1093/ajcp/45.4_ts.493

Bernal, M.P., Alburquerque, J.A. and Moral, R., 2009. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. Bioresource Technology 100: 5444–5453. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.027

Cao, R., Ben, W., Qiang, Z. and Zhang, J., 2020. Removal of antibiotic resistance genes in pig manure composting influenced by inoculation of compound microbial agents. Bioresource Technology 317: 123966. https://doi.org/10.1016/j. biortech.2020.123966

de Bertoldi, M., Vallini, G. and Pera, A., 1983. The biology of composting: a review. Waste Management Research 1: 157–176. https://doi.org/10.1016/0734-242X(83)90055-1

Congilosi, J.L. and Aga, D.S., 2021. Review on the fate of antimicrobials, antimicrobial resistance genes, and other micropollutants in manure during enhanced anaerobic digestion and composting. Journal of Hazardous Materials 405: 123634. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123634

Finstein, M.S., Miller, F.C., MacGregor, S.T. and Psarianos, K.M., 1985. The Rutgers strategy for composting: process design and control. EPA Project Summary, EPA 600/S2-85/059, Cincinnati, Ohio. https://DOI:10.17660/ActaHortic.1992.302.7

Gómez, R.S., Angeles, M.L., Núnez, H.G. y Figueroa, V.U., 2013. Guía de buenas prácticas de manejo de excretas: Metodologías para la elaboración de compostas y lombricompostas de excretas de ganado de leche. Centro

Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal, INIFAP-SAGARPA, México. Libro Técnico 20: 1-52. http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/4126

Gómez, R.S., Angeles, M.L. y Becerra, J., 2011. Alternativas para el reciclaje de excretas animales. Uso de humus de lombriz y otros derivados de la lombricultura. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal, INIFAP-SAGARPA, México. Publicación Técnica 14: 1-64.

Kämpfer, P., 2014. Acinetobacter. In: Batt, C.A. and Tortorello, M.L. Encyclopedia of Food Microbiology, 1: 11-17. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00002-1

Kyakuwaire, M., Olupot, G., Amoding, A., Nkedi-Kizza, P. and Basamba, T.A., 2019. How safe is chicken litter for land application as an organic fertilizer? A review. International Journal of Environmental Research and Public Health 16: 3521. https://doi.org/10.3390/ijerph16193521

Marti, R., Scott, A., Tien, Y.C., Murray, R., Sabourin, L., Zhang, Y. and Topp, E., 2013. Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. Applied and Environmental Microbiology 79: 5701–5709. https://doi.org/10.1128/aem.01682-13

Monroy, F., Aira, M. and Domínguez, J., 2008. Changes in density of nematodes, protozoa and total coliforms after transit through the gut of four epigeic earthworms (Oligochaeta). Applied Soil Ecology 39: 127–132. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.11.011

Monroy, F., Aira, M. and Dominguez, J., 2009. Reduction of total coliform numbers during vermicomposting is caused by short-term direct effects of earthworms on microorganisms and depends on the dose of application of pig slurry. Science of the Total Environment 407: 5411–5416. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.06.048

Mupondi, L.T.; Mnkeni, P.N.S.; Muchaonyerwa, P. Effectiveness of combined thermophilic composting and vermicomposting on biodegradation and sanitization of mixtures of dairy manure and waste paper. African Journal of Biotechnology, 2010, 9, 4754–4763. https://doi.org/10.5897/AJB09.1894.

Nakasaki, K. and Hirai, H., 2017. Temperature control strategy to enhance the activity of yeast inoculated into compost raw material for accelerated composting. Waste Management 65: 29-36. https://doi:10.1016/j.wasman.2017.04.019

Parthasarathi, K., Ranganathan, L.S., Anandi, V, and Zeyer, J., 2007. Diversity of microflora in the gut and casts of tropical composting earthworms reared on different substrates. Journal of Environmental Biology 28: 87-97. PMID: 17717992.

Percival, S.L., Williams, D.W., 2014. Acinetobacter. In: Percival, S.L., Yates, M.V., Williams, D.W., Chalmers, R.M. and Gray, N.F. Microbiology of Waterborne Diseases - Microbiological Aspects and Risks. Second Edition 35-48. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00002-0

Pissetti, C., Kich, J.D., Allen, H.K., Navarrete, C., de Freitas Costa, E., Morés, N. and Cardoso, M., 2021. Antimicrobial resistance in commensal Escherichia coli and Enterococcus spp. isolated from pigs subjected to different antimicrobial administration protocols. Research in Veterinary Science. 137: 174-185. http://dx.doi:10.1016/j.rvsc.2021.05.001

Poirel, L., Madec, J.Y., Lupo, A., Schink, A.K., Kieffer, N., Nordmann, P. and Schwarz, S., 2018. Antimicrobial Resistance in Escherichia coli. Microbiology Spectrum 6: 1-27. http://dx.doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017

Rentería-Flores, J.A., Gómez-Rosales, S., López-Hernández, L.H., Ordaz-Ochoa, G., Anaya-Escalera, A.M., Mejía-Guadarrama C.A. y Mariscal-Landín, G., 2021 Principales aportes de la investigación del INIFAP a la nutrición porcina en México: retos y perspectivas. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias 24:(Suppl 3): 79-110. https://doi.org/10.22319/rmcp.v12s3.5866.

Saba, S., Zara, G., Bianco, A., Garau, M., Bononi, M., Deroma, M., Pais, A. and Budroni, M., 2019. Comparative analysis of vermicompost quality produced from brewers' spent grain and cow manure by the red earthworm Eisenia fetida. Bioresource Technology 293: 122019. https://doi:10.1016/j.biortech.2019.122019

Sinha, K.S., Bharambe, G. and Chaudhari, U., 2008. Sewage treatment by vermifiltration with synchronous treatment of sludge by earthworms: a low-cost sustainable technology over conventional systems with potential for decentralization. The Environmentalist: the International Journal for all Environmental Professionals 28: 409-420. https://DOI:10.1007/S10669-008-9162-8

Sinha, R.K., Herat, S., Valani, D. and Chauhan, K., 2009. Vermiculture and sustainable agriculture. Journal of Agricultural and Environmental Sciences 5:55–57. http://www.idosi.org/aejaes/jaes5(S)/...

Sinha, R.K., Herat, S., Bharambe, G. and Brahambhatt, A., 2010. Vermistabilization of sewage sludge (biosolids) by earthworms: converting a potential biohazard destined for landfill disposal into a pathogen-free, nutritive and safe biofertilizer for farms. Waste Management Research 28: 872-881. https://doi:10.1177/0734242X09342147

Smith, S.D., Colgan, P., Yang, F., Rieke, E.L., Soupir, M.L., Moorman, T.B., Allen, H.K. and Howe, A., 2019. Investigating the dispersal of antibiotic resistance associated genes from manure application to soil and drainage waters in simulated agricultural farmland systems. PLoS One 14: e0222470. https://doi.org/10.1371/journal. pone.0222470.

TMECC., 2002. Test Methods for the Examination of Composting and Compost. US Composting Council, Bethesda, MD.

Vanotti, M.B., Millner, P.D., Hunt, P.G. and Ellison, A.Q., 2005. Removal of pathogen and indicator microorganisms from liquid swine manure in multi-step biological and chemical treatment. Journal of Bioresource Technology 96: 209–214. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.05.010

Wang, H., Li, H., Gilbert, J.A., Li, H., Wu, L., Liu, M., Wang, L., Zhou, Q., Yuan, J. and Zhang, Z., 2015. Housefly Larva Vermicomposting Efficiently Attenuates Antibiotic Resistance Genes in Swine Manure, with Concomitant Bacterial Population Changes. Applied Environmental Microbiology. 81: 7668-7679. https://doi:10.1128/AEM.01367-15

Zhou, X., Qiao, M., Su, J.Q., Wang, Y., Cao, Z.H., Cheng, W.D. and Zhu, Y.G., 2019. Turning pig manure into biochar can effectively mitigate antibiotic resistance genes as organic fertilizer. Science of the Total Environment 649: 902–908. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.368