

# Efecto de las lombrices de tierra en la estructura y función de las comunidades microbianas en el proceso de descomposición de la materia orgánica

M. Gómez-Brandón <sup>1</sup>

(1) Departamento de Ecología y Biología Animal. Facultad de Biología, Campus de Lagoas-Marcosende, Universidad de Vigo, E-36310 Vigo, España.

➤ Recibido el 19 de noviembre de 2010, aceptado el 7 de diciembre de 2011.

**Gómez-Brandón, M. (2011). Efecto de las lombrices de tierra en la estructura y función de las comunidades microbianas en el proceso de descomposición de la materia orgánica. *Ecosistemas* 20(1):155-162.**

Las lombrices de tierra representan la mayor biomasa animal edáfica en la mayoría de ecosistemas templados terrestres (Edwards y Bohlen, 1996), y allí donde son abundantes pueden procesar a través de sus cuerpos hasta 250 toneladas del suelo por hectárea y año (Lavelle et al., 1997). Este inmenso trabajo influye de forma muy significativa en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, y otorga a estos organismos un papel crucial en la modificación de la estructura del suelo, en la aceleración de la descomposición de la materia orgánica y del reciclado de nutrientes a través de sus interacciones con la microbiota descomponedora (Domínguez et al., 2010); sin embargo, la investigación de estas interacciones es escasa. Además, su conocimiento es clave para entender los mecanismos biológicos que rigen el vermicompostaje, un proceso aerobio de degradación y tratamiento de residuos orgánicos basado en la acción conjunta y sinérgica de algunas especies de lombrices de tierra y los microorganismos (Domínguez, 2004).

Para poder estudiar dichas interacciones es necesario el uso de técnicas que nos permitan caracterizar la estructura y función de las comunidades microbianas. Entre estas técnicas, el análisis de los ácidos grasos es una buena medida para determinar la estructura de las comunidades microbianas (Zelles, 1999). Sin embargo, la metodología puesta a punto para suelos se ha aplicado directamente para el análisis de los ácidos grasos de muestras con un alto contenido en materia orgánica. Por eso se planteó como primer objetivo de esta tesis doctoral la optimización del análisis de los ácidos grasos en muestras sólidas orgánicas. En los capítulos restantes se estudiaron las relaciones que las lombrices de tierra establecen con los microorganismos durante el proceso de descomposición de la materia orgánica a través de los siguientes objetivos específicos: 1) Estudiar el efecto del paso de la materia orgánica en descomposición a través del intestino de las lombrices de tierra en la estructura y función de las comunidades microbianas; 2) Determinar cómo afecta el tipo de sustrato orgánico y la especie de lombriz de tierra en la estructura y función de las comunidades microbianas; 3) Estudiar los cambios en la estructura y función de las comunidades microbianas que se producen durante el proceso de vermicompostaje.

## Optimización del análisis de los ácidos grasos en muestras ambientales sólidas: elección del método de extracción y de derivatización

Existen dos metodologías basadas en el uso de los ácidos grasos como biomarcadores para la caracterización de las comunidades microbianas de muestras ambientales sólidas; éstas son el análisis de los ácidos grasos totales y el análisis de los ácidos grasos de los fosfolípidos (PLFAs, *phospholipid fatty acids*). Una ventaja importante de esta última técnica en comparación con los ácidos grasos totales es que debido a que los PLFAs se sintetizan rápidamente durante el crecimiento

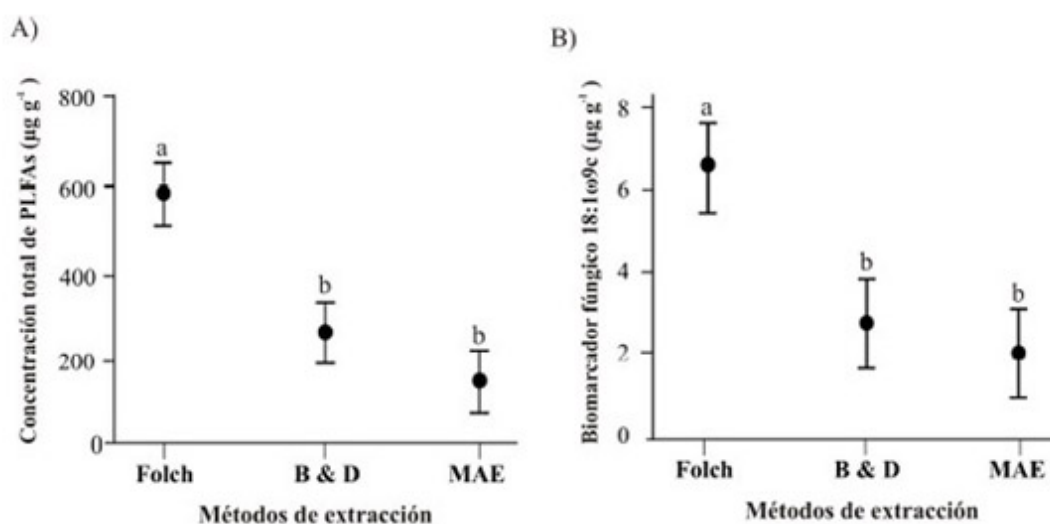
microbiano, y se degradan rápidamente tras la muerte celular, son indicadores de la comunidad microbiana activa (Zelles, 1999).

Mucho antes de que estas técnicas se aplicasen en estudios de ecología microbiana, el análisis de los ácidos grasos se utilizó para la determinación del contenido lipídico de tejidos animales (Folch et al., 1957; Bligh y Dyer, 1959). Para el análisis de los ácidos grasos de muestras ambientales sólidas se suelen utilizar variantes del método Bligh y Dyer en cuyas mezclas extractantes se incluye un tampón en vez de agua (White et al., 1979; Frostegård et al., 1991). Otro método de extracción diferente, basado en el uso de la energía de las microondas, también se ha utilizado en la determinación del contenido lipídico de tejidos biológicos (Batista et al., 2001) y, recientemente, en la extracción de ácidos grasos de muestras ambientales sólidas (Lores et al., 2006).

Debido a la polaridad y baja estabilidad térmica de los ácidos grasos, éstos se transforman en sus respectivos ésteres metílicos (FAMEs, *fatty acid methyl esters*) para ser analizados por cromatografía de gases. La metanolisis alcalina, proceso de transesterificación catalizado principalmente por los hidróxidos de sodio o potasio (White y Ringelberg, 1998) es el mecanismo de derivatización más utilizado en el análisis de los ácidos grasos de muestras ambientales sólidas. Algunas bases orgánicas fuertes como el hidróxido de trimetilsulfonio (TMSH, *trimethylsulfonium hydroxide*) también se han utilizado como agentes derivatizantes en el análisis de este tipo de muestras (Lores et al., 2006).

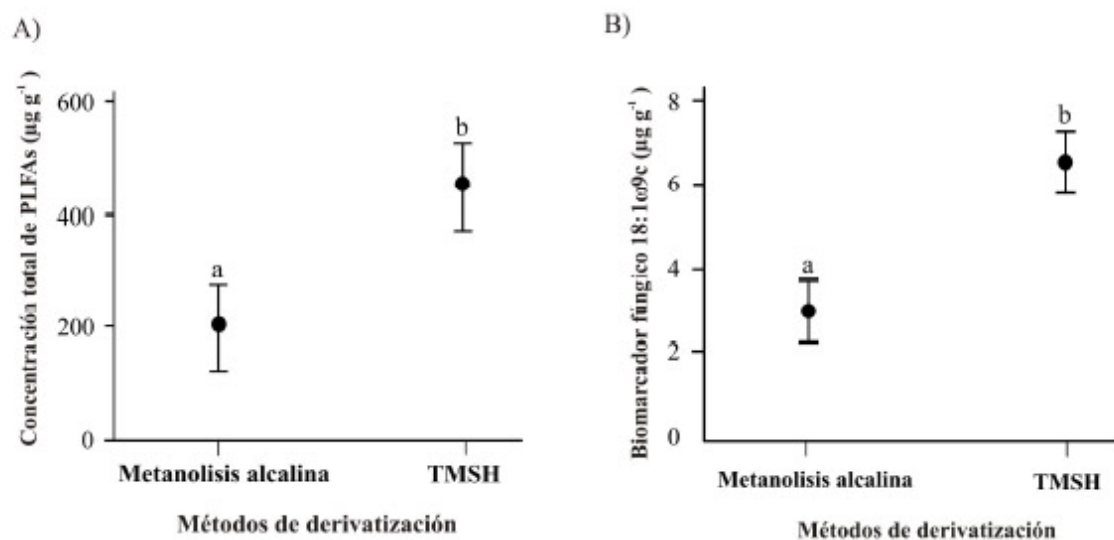
Bajo la premisa de que los métodos utilizados en suelo han sido aplicados directamente en el análisis de muestras sólidas orgánicas, en el primer capítulo de la presente tesis se compararon las combinaciones de tres métodos de extracción (una variante del método de Folch; una variante del método Bligh & Dyer (B & D); y la extracción asistida por microondas (*microwave assisted extraction*, MAE)) y dos métodos de derivatización (metanolisis alcalina y derivatización con TMSH) para la determinación de los ácidos grasos totales y de los PLFAs en un amplio rango de muestras sólidas orgánicas (residuos ganaderos, compost y vermicompost). También se analizaron muestras de suelo para así testar la eficacia de los métodos de extracción y derivatización utilizados comúnmente en el análisis de los ácidos grasos de este tipo de muestras; éstos son, la variante del método Bligh & Dyer y la metanolisis alcalina.

La concentración total de ácidos grasos obtenida con el método de Folch fue mayor que con los otros dos métodos de extracción evaluados. Además, el rendimiento de la variante del método B & D fue similar al obtenido con la extracción asistida por microondas. El método de Folch también rindió la mayor concentración de PLFAs, así como la concentración de las distintas clases estructurales y de los ácidos grasos biomarcadores (**Fig. 1**).



**Figura 1.** Efecto de los tres métodos de extracción evaluados (variante del método de Folch; variante del método B y D, y extracción asistida por microondas) sobre la concentración total de PLFAs (A) y la concentración del biomarcador fúngico 18:1ω9c (B) en todo el rango de muestras analizadas. Los valores son medias  $\pm$  error estándar. Las diferencias significativas entre los valores de concentración obtenidos se representan con diferentes letras ( $P < 0,05$ , test HSD de Tukey).

La conversión de los ácidos grasos en sus respectivos ésteres metílicos fue mayor utilizando el TMSH como agente derivatizante que con la metanolisis alcalina. Este método también rindió la mayor concentración de PLFAs. Además, la concentración de las distintas clases estructurales y de la mayoría de los ácidos grasos biomarcadores fue mayor con este método de derivatización (**Fig. 2**).

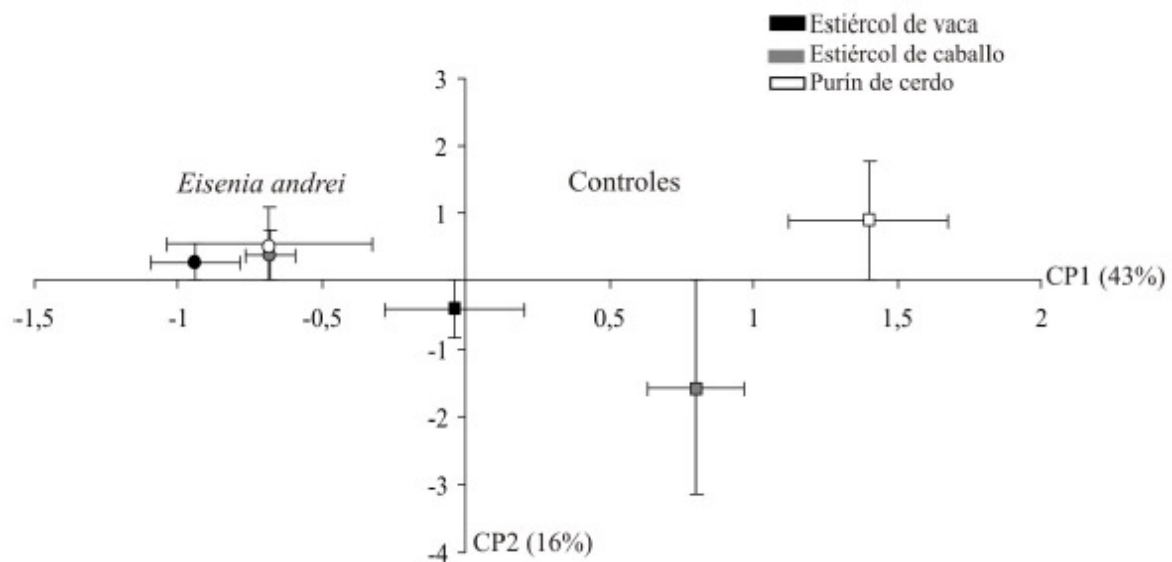


**Figura 2.** Efecto de los dos métodos de derivatización evaluados (metanolisis alcalina y derivatización con TMSH) sobre (A) la concentración total de PLFAs y (B) la concentración del biomarcador fúngico 18:1ω9c en todo el rango de muestras analizadas. Los valores son medias  $\pm$  error estándar. Las diferencias significativas entre los valores de concentración obtenidos se representan con diferentes letras ( $P < 0,05$ , test HSD de Tukey).

Por tanto, la extracción con la variante del método de Folch seguida de la derivatización con TMSH resultó ser la combinación de métodos óptima para el análisis de los ácidos grasos totales y de los PLFAs en una amplia gama de muestras ambientales sólidas, entre las que se incluyen muestras con un alto contenido en materia orgánica y suelo. Además, con esta combinación de métodos se redujo la complejidad del proceso de extracción y de derivatización, y el tiempo de preparación de la muestra. Estos resultados cuestionan el hecho de que, a pesar de ser procesos más lentos y tediosos, el método Bligh & Dyer modificado y la metanolisis alcalina sigan siendo los métodos de análisis de ácidos grasos de mayor uso en estudios de ecología microbiana.

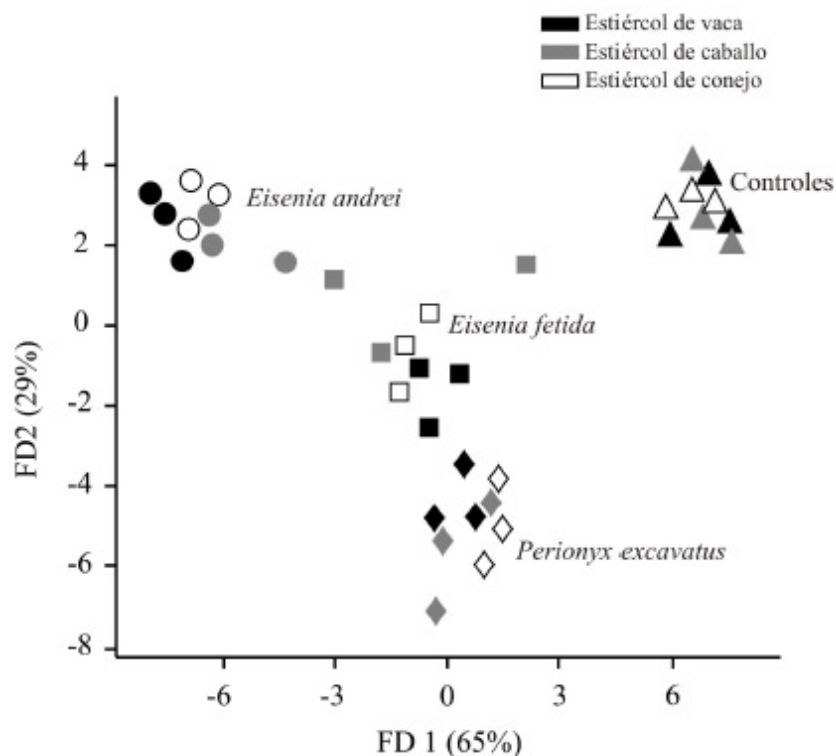
## Las lombrices de tierra y la descomposición de la materia orgánica

Las lombrices de tierra interactúan con los microorganismos a través, en primer lugar, de los procesos asociados al paso de la materia orgánica en descomposición a través de sus intestinos. Así, en el segundo capítulo de la presente tesis se evaluaron los cambios en la biomasa y la actividad microbiana de tres residuos ganaderos de diferente naturaleza (estiércol de vaca, estiércol de caballo y purín de cerdo) a través del intestino de la lombriz de tierra epigea *Eisenia andrei*. Para ello se analizaron los materiales excretados por las lombrices después de 24 h y se compararon con un tratamiento control. Hay evidencias recientes que sugieren una reducción de la biomasa microbiana tras el tránsito a través del intestino de estas lombrices (revisado en Domínguez et al. 2010). En concordancia con este estudio, nos encontramos con que el paso de la materia orgánica en descomposición a través del intestino de la lombriz epigea *E. andrei* produjo una disminución de la biomasa microbiana activa estimada como la concentración total de PLFAs en comparación con el control. Asimismo, se registró una reducción en la biomasa bacteriana y fúngica medidas mediante el uso de determinados PLFAs biomarcadores; y en la actividad microbiana total estimada mediante la hidrólisis de diacetato de fluoresceína. Se observó además que el paso de los tres residuos ganaderos a través del intestino de esta lombriz minimizó las diferencias entre sus comunidades microbianas, tal y como muestra el análisis de componentes principales de los distintos PLFAs identificados (**Fig. 3**).



**Figura. 3.** Análisis de componentes principales de los perfiles de PLFAs de los tres residuos ganaderos en ausencia de lombrices (control, □) y tras su paso por el intestino de la lombriz de tierra epigea *Eisenia andrei* (●). Los valores son medias  $\pm$  error estándar. Las dos primeras componentes principales (CP1 y CP2) explicaron el 59% de la varianza total del modelo.

Los efectos de las lombrices de tierra sobre las comunidades microbianas pueden variar dependiendo del tipo de sustrato y de la especie de lombriz considerada (Monroy et al., 2008; Knapp et al., 2009). Por eso, en la primera y segunda sección del tercer capítulo de esta tesis se estudiaron los efectos de distintas especies de lombrices de tierra epigeas sobre la estructura y función de las comunidades microbianas de diferentes residuos ganaderos. Nos encontramos con que con la caracterización de las comunidades microbianas sobre la base de los perfiles de PLFAs, los residuos ganaderos analizados se clasificaron, tras un mes de procesado por las lombrices epigeas, en función de la especie de lombriz empleada; se observa además una clara separación con respecto al tratamiento control (**Fig. 4**). También se observó que los vermicompost obtenidos con diferentes especies de lombrices de tierra (*Eisenia andrei*, *Lumbricus rubellus* y *Eudrilus eugeniae*) se diferenciaron en función del tipo de sustrato empleado en el proceso de vermicompostaje.

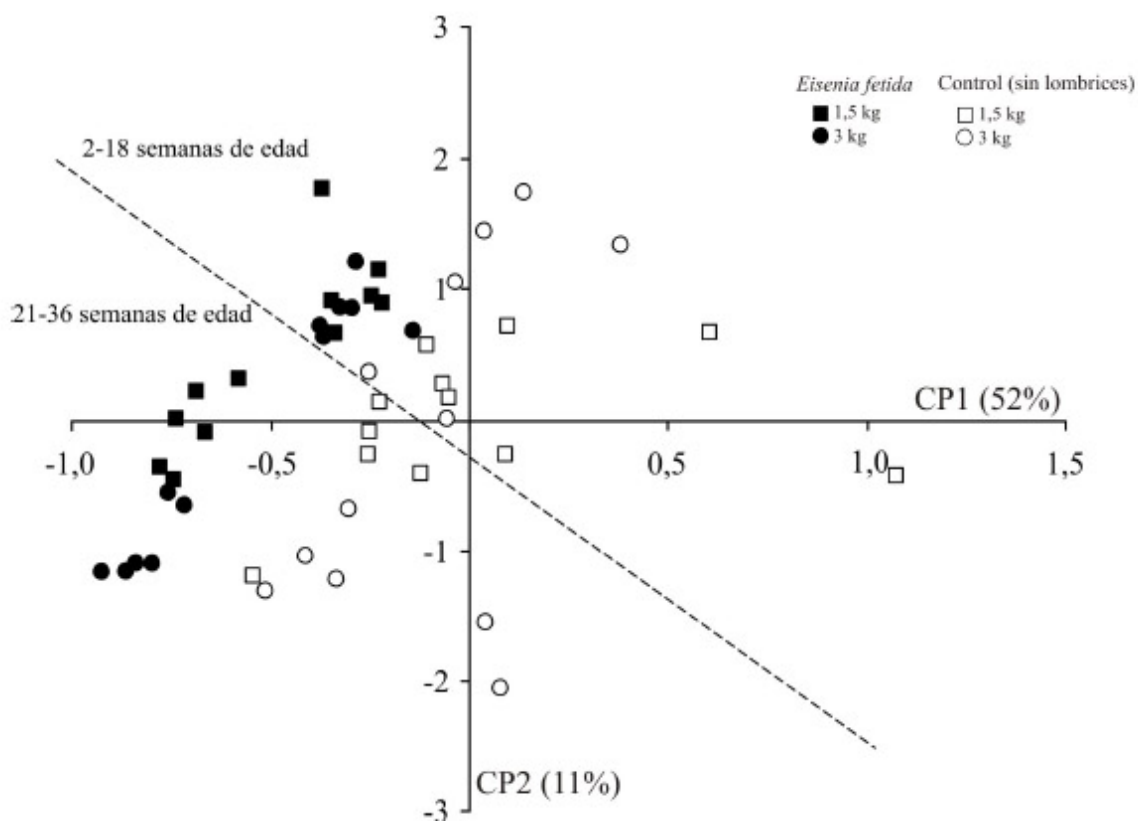


**Figura 4.** Análisis discriminante de los perfiles de PLFAs de los tres estiércoles animales (estiércol de vaca, estiércol de caballo y estiércol de conejo) en ausencia de lombrices (control,  $\Delta$ ) y en presencia de las lombrices de tierra epigeas *Eisenia andrei* ( $\circ$ ), *Eisenia fetida* ( $\square$ ) y *Perionyx excavatus* ( $\diamond$ ). Las dos primeras funciones discriminantes (FD1 y FD2) explicaron el 94% de la varianza total del modelo.

En la tercera sección de este capítulo se estudiaron los cambios en la estructura y función de las comunidades microbianas de un residuo vegetal como resultado de la actividad de la lombriz epigea *Eisenia andrei* ya que, las lombrices de tierra juegan también un papel clave en la descomposición de residuos vegetales a través de sus relaciones con los microorganismos (Seeber et al., 2006). El residuo vegetal empleado fue bagazo de uva, un material derivado de la industria vitivinícola formado por los restos sólidos que quedan después de la extracción del mosto de los racimos de uvas. Se trata de un sustrato rico en celulosa, hemicelulosa y lignina, y también en compuestos carbonados de fácil asimilación; por lo que se espera un efecto inmediato de las lombrices en la descomposición de este sustrato mediante la modificación de las comunidades microbianas. En concordancia con el capítulo 2, observamos que tras quince días de actividad de las lombrices en el bagazo de uva, se produjo una disminución de la biomasa bacteriana y fúngica, así como de la actividad microbiana total y de las actividades enzimáticas celulasa y proteasa. Tales cambios afectaron a los perfiles fisiológicos de la comunidad microbiana del bagazo de uva (sistema Biolog® Ecoplate). Así, la actividad de las lombrices epigeas afectó a la disponibilidad de algunas de las fuentes de carbono analizadas (carbohidratos y ácidos carboxílicos), mientras que se vieron favorecidas aquellas poblaciones microbianas especializadas en el uso de polímeros y aminoácidos, resultando en una mayor diversidad de sustrato en comparación con el control.

La rapidez con la que ocurren las transformaciones químicas, bioquímicas y microbiológicas de los sustratos orgánicos durante el vermicompostaje hacen de este proceso un buen sistema para estudiar las relaciones entre las lombrices de tierra y los microorganismos durante la descomposición de la materia orgánica. El vermicompostaje incluye dos fases diferentes en relación a la actividad de las lombrices de tierra, (i) una *fase activa o directa*, durante la cual las lombrices procesan la materia orgánica, modificando sus propiedades físicas y su composición microbiana a través de los procesos asociados al paso a través de sus intestinos (Domínguez et al., 2010); y (ii) una *fase de maduración o indirecta* durante la que los microbios asumen el control de la descomposición del material previamente procesado por las lombrices (Aira et al., 2007). La mayoría de los estudios realizados se han centrado en el análisis del producto final (vermicompost), y en este sentido son necesarios más trabajos en los que se evalúen los cambios en la estructura y función de las comunidades microbianas que tienen lugar a lo largo del proceso. Es por ello que en el cuarto capítulo de esta tesis se utilizaron reactores de alimentación continua formados por una capa inicial de vermicompost que funcionó como cama para las lombrices (*Eisenia fetida*) sobre la que se dispusieron capas de purín de cerdo (1,5 y 3 kg) hasta alcanzar un total de 12. Las capas que conforman cada reactor están datadas formando un gradiente de edad que va de las capas superiores, las más jóvenes, con edades comprendidas entre 2 y 18 semanas de edad; hasta las capas inferiores, con edades entre 21 y 36 semanas. En concordancia con los

capítulos anteriores, nos encontramos con que la actividad de la lombriz de tierra *E. fetida* redujo la biomasa microbiana activa, así como la biomasa bacteriana y fúngica en comparación con el tratamiento control (reactores en ausencia de lombrices). Esta reducción en la biomasa microbiana se vio reflejada en cambios en los perfiles de PLFAs, tal y como se observa en la **Figura 5**. Nos encontramos con que los reactores con lombrices se diferenciaron claramente de los reactores control a lo largo de la primera componente (**Fig. 5**); observamos, además, una clara separación entre las capas superiores e inferiores de los reactores con y sin lombrices para ambas dosis de aplicación (**Fig. 5**). A diferencia de la biomasa microbiana, la actividad de las lombrices epigeas incrementó la actividad microbiana total en las capas de 2 a 8 semanas de edad; mientras que, en las capas restantes, principalmente en aquellas con edades comprendidas entre 21 y 36 semanas, su valor se redujo con respecto al control. También se observó una disminución de la concentración de carbono total y de carbono orgánico disuelto en comparación con el control.



**Figura 5.** Análisis de componentes principales de los perfiles de PLFAs en ausencia de lombrices (control) y en presencia de la lombriz de tierra *Eisenia fetida* en los reactores de alimentación continua cuya dosis de aplicación de sustrato es de 1,5 y 3 kg. Las dos primeras componentes principales (CP1 y CP2) explicaron el 63% de la varianza total del modelo.

En su conjunto, los resultados mostrados en la presente tesis ponen de manifiesto que (1) el análisis de los ácidos grasos resultó ser una técnica de análisis muy potente para evaluar el efecto de las lombrices de tierra en la estructura de las comunidades microbianas; (2) las lombrices de tierra influyeron de forma muy significativa en la estructura y función de las comunidades microbianas a través de los procesos asociados al intestino de las mismas; reduciendo tanto la biomasa como la actividad microbiana y minimizando las diferencias entre las comunidades microbianas de los sustratos iniciales; (3) los efectos de las lombrices en la estructura y función de las comunidades microbianas han demostrado ser distintos en función del material de partida y de la especie de lombriz; (4) las lombrices jugaron un papel clave durante la fase activa de vermicompostaje acelerando la descomposición de la materia orgánica y afectando, en consecuencia, a la biomasa microbiana y su actividad durante la etapa de maduración.

## Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por el proyecto CTM2009-08477 concedido por el Ministerio de Ciencia e Innovación. María Gómez Brandón ha estado financiada por una beca del programa de formación del profesorado universitario (FPU) del Ministerio de Educación.

## Referencias

- Aira M., Monroy F., Domínguez J. 2007. Microbial biomass governs enzyme activity decay during aging of worm-worked substrates through vermicomposting. *Journal of Environmental Quality* 36:448-452.
- Batista A., Vetter W., Luckas B. 2001. Use of focused open vessel microwave assisted extraction as prelude for the determination of the fatty acid profile of fish – a comparison with results obtained after liquid-liquid extraction according to Bligh and Dyer. *European Food Research and Technology* 212:377-384.
- Bligh E.G., Dyer W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37:911-917.
- Domínguez J. 2004. State of the art and new perspectives on vermicomposting research. En: Edwards, C.A. (Ed.). *Earthworm Ecology*, pp. 401-424. CRC Press, Boca Raton FL USA.
- Domínguez J., Aira M., Gómez-Brandón M. 2010. Vermicomposting: earthworms enhance the work of microbes. En: Insam, H., Franke-Whittle, I., Goberna, M. (Eds). *Microbes at work: from wastes to resources*, pp.93-114. Springer-Verlag, Berlin Heilderberg, Germany.
- Edwards C.A., Bohlen P.J. 1996. *Biology and Ecology of Earthworms*. 426 pp. Chapman and Hall, London, UK.
- Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226:497-509.
- Frostegård Å., Tunlid A., Bååth E. 1991. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. *Journal of Microbiological Methods* 14:151-163.
- Knapp B.A., Podmirseg S.M., Seeber J., Meyer E., Insam H. 2009. Diet-related composition of the gut microbiota of *Lumbricus rubellus* as revealed by a molecular fingerprinting technique and cloning. *Soil Biology and Biochemistry* 41:2299-2307.
- Lavelle P., Bignell D., Lepage M., Wolters V., Roger P., Ineson P., Heal O.W., Ghillion S. 1997. Soil function in a changing world: The role of invertebrate ecosystem engineers. *European Journal of Soil Biology* 33:159-193.
- Lores M., Gómez-Brandón M., Pérez-Díaz D., Domínguez J. 2006. Using FAME profiles for the characterization of animal wastes and vermicomposts. *Soil Biology and Biochemistry* 38:2993-2996.
- Monroy F., Aira M., Domínguez J. 2008. Changes in density of nematodes, protozoa and total coliforms after transit through the gut of four epigeic earthworms (Oligochaeta). *Applied Soil Ecology* 39:127-132.
- Seeber J., Scheu S., Meyer E., 2006. Effects of macro-decomposers on litter decomposition and soil properties in alpine pastureland: A mesocosm experiment. *Applied Soil Ecology* 34:168-175.
- White D.C., Davis W.M., Nickels J.S., King J.D., Bobbie R.J. 1979. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia* 40:51-62.
- White D.C., Ringelberg D.B. 1998. Signature lipid biomarker analysis. En: Burlage, R.S., Atlas, R., Stahl, D., Geesey, G., Saylor, G. (Eds.). *Techniques in Microbial Ecology*, pp. 255–272. Oxford University Press, New York.
- Zelles L. 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities: a review. *Biology and Fertility of Soils* 29:111–129.

## MARÍA GOMEZ BRANDÓN

Efecto de las lombrices de tierra en la estructura y función de las comunidades microbianas en el proceso de descomposición de la materia orgánica

Tesis doctoral

Departamento de Ecología y Biología Animal, Universidad de Vigo

Abril 2010

Dirección: Jorge Domínguez Martín y Marta Lores Agúin

### Publicaciones resultantes de la tesis

Domínguez, J., Aira, M., Gómez-Brandón, M. 2010. Vermicomposting: earthworms enhance the work of microbes. En: Insam, H., Franke-Whittle, I., Goberna, M. (Eds), pp. 93-114. *Microbes at Work: from Wastes to Resources*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Germany.

Gómez-Brandón, M., Lores, M., Domínguez, J. 2008. Comparison of extraction and derivatization methods for fatty acid analysis in solid environmental matrixes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392:505-514.

Gómez-Brandón M., Lores M., Domínguez J. 2010. A new combination of extraction and derivatization methods that reduces the complexity and preparation time in determining phospholipid fatty acids in solid environmental samples. *Bioresource Technology* 101:1348-1354.

Gómez-Brandón, M., Lazcano, C., Lores, M., Domínguez, J. 2010. Detritivorous earthworms modify microbial community structure and accelerate plant residue decomposition. *Applied Soil Ecology* 44:237-244.

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

Gómez-Brandón, M., Aira, M., Lores, M., Domínguez, J. 2011. Changes in microbial community structure and function during vermicomposting of pig slurry. *Bioresource Technology* 102:4171-4178.

Lores, M., Gómez-Brandón, M., Pérez-Díaz, D., Domínguez, J. 2006. Using FAME profiles for the characterization of animal wastes and vermicomposts. *Soil Biology and Biochemistry* 38:2993-2996.

Lores, M, Gómez-Brandón, M., Domínguez, J. 2010. Tracking down microbial communities via fatty acids analyses: analytical strategy for solid organic samples. En: Méndez-Vilas, A. (ed.), pp. 1502-1508. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Microbiology Book Series. Formatex Research Center, Badajoz, España. Disponible en: <http://www.formatex.info/microbiology2/1502-1508.pdf>