

## Análisis e identificación de bioestimulantes indólicos en una composta

Ignacio García<sup>1</sup> y Leandro Rodrigo González<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Simón Bolívar, México, D. F., <sup>2</sup>Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Estado de México

### Resumen

*La producción de composta es una alternativa para el manejo y disposición de los residuos sólidos orgánicos. La composta como acondicionador y mejorador de suelos se emplea en la agricultura y jardinería a modo de fertilizante.*

*En este trabajo, se emplearon muestras de composta comercial para evaluar su actividad biológica. Se obtuvieron extractos de composta purificados mediante solventes orgánicos acuosos y cromatografía en columna (Adsorbex LiChrolut RP-18). La actividad biológica se evaluó empleando bioensayos de la inhibición de la raíz de cress (*Lepidium sativum*), amaranto (*Amaranthus hybridus*) y trigo (*Triticum aestivium*). Para el análisis estructural del extracto purificado de composta se utilizó un espectrofotómetro de infrarrojo con transformadas de Fourier FT-IR modelo 1600 Perkin Elmer, en la región de 4400-450  $\text{cm}^{-1}$ . Los resultados evidenciaron la presencia de compuestos de peso molecular similar al ácido indol acético en el extracto purificado de composta, lo que indicaba que la muestra poseía actividad biológica. De tal forma, se concluyó que la composta contiene al menos un bioestimulante indólico.*

**Palabras clave:** bioestimulantes; composta; reguladores del crecimiento vegetal.

### Abstract

*The production of compost is one of the alternatives for the disposal of non-hazardous solid wastes. Compost is used in agriculture and gardening as fertilizer. Samples for commercial compost were used to evaluate biological activity. The extract from compost was done using organic solvents and shaking the sample for about 24 hours under relatively low temperature (2-4 °C). The purification was made using Adsorbex LiChrolut RP-18 column packed with synthetic silica gel. The bioassays play an important role in the identification of substances actives in compost. The bioassays consisted in the root growth test of cress (*Lepidium sativum*), amaranto (*Amaranthus hybridus*) and wheat (*Triticum aestivium*). Three replicates of each sample were analyzed in each one the four bioassays. The FT-infrared spectrum of extract compost in the region 4400-450  $\text{cm}^{-1}$  was measured on a Perkin Elmer 1600 spectrometer. Bioassay demonstrates the presence of compound with biological activity, in our analysis was corroborated. We can conclude therefore, that there is sufficient evidence of a compound with biological activity in the analyzed sample of the compost which is similar to indol acetic acid*

**Keywords:** biostimulants; compost; plant growth regulators.

## Introducción

El composteo es un proceso de fermentación aerobia en fase sólida en el que se aprovecha el fenómeno de "autocalentamiento" de las diferentes poblaciones microbianas nativas que se suceden para la biodegradación total o parcial de la materia orgánica, bajo condiciones controladas, con el objeto de obtener un producto estable denominado composta. Durante este proceso, se degrada la materia orgánica, se estimula la actividad microbiana y se aumentan los índices de mineralización, convirtiendo rápidamente el sustrato en sustancias parecidas al humus (Tchobanoglous, Theisen y Vigil, 1993; Atiyeh, Lee, Edwards, Arancon, Metzger, 2002).

En años recientes, ha aumentado enormemente el uso de los procesos de composteo para el tratamiento de una amplia gama de residuos orgánicos, incluyendo lodos de plantas de aguas residuales, residuos agroindustriales e industriales para la producción de compostas (Tchobanoglous *et al.*, 1993; García-Martínez, 1997; Atiyeh, Edwards, Subler y Metzger, 2001; Atiyeh *et al.*, 2002).

El uso de la composta favorece las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, y aumenta su fertilidad porque incrementa la disponibilidad de los nutrientes y mejora la estructura y la capacidad de retención de agua. Estos efectos se ven reflejados directamente en un mayor rendimiento de los cultivos, debido a la generación de plantas más vigorosas y con mayor resistencia a algunas plagas y enfermedades (Cooper, Liu y Fisher, 1998; Canellas y Facanha, 2004). La composta suele emplearse en una gran variedad de cultivos de cereales, legumbres y plantas ornamentales, pero en su mayoría sólo se emplean a nivel invernadero y en muy pocos casos se realizan en el campo (Wilson y Carlile, 1989; Buckerfield, Flavel, Lee y Webster, 1999; Nethra, Jayaprasad y Kalem, 1999; Atiyeh *et al.*, 2001).

A pesar de la gran respuesta en la aplicación de compostas para el aumento en la producción de cultivos, mejoras estructurales de suelos y el incremento en la disponibilidad de nutrientes, el uso de la composta genera otros fenómenos—cuya presencia aún no se explica—, como el mejoramiento en la germinación, el crecimiento y desarrollo de semillas, la disminución en el tiempo de floración y fructificación, el aumento en el tamaño de los frutos, una menor incidencia de enfermedades de los cultivos, una actividad de micorrización favorecida y la disminución casi total de la población parasitaria de nematodos, entre otros.

Independientemente del *pool* de nutrientes presente y su forma fácilmente asimilable, estos beneficios se generan cuando se utilizan cantidades relativamente pequeñas de composta, en un rango del 10-40%, a concentraciones mayores no se han observado mejorías en los cultivos y, en algunos casos, han provocado trastornos en ellos.

Las plantas sintetizan de manera natural algunas sustancias, denominadas bioestimulantes y/o reguladores del crecimiento vegetal, que en cantidades pequeñas promueven, no sólo el crecimiento vegetal, sino otras funciones fisiológicas (Buckerfield *et al.*, 1999; Maich, Lorello, Torres, Rolando y Torres, 2003; Canellas y Facanha, 2004; Slavik, 2005). Aún no se sabe con exactitud cuál es la razón o el mecanismo por el cual las compostas producen todos estos efectos benéficos, similares a los bioestimulantes, en el desarrollo de los cultivos.

Un gran número de reportes demuestran que los bioestimulantes son producidos por microorganismos, y se ha sugerido que la promoción de la actividad microbiana sobre la materia orgánica por el composteo da lugar a la producción de cantidades significativas de bioestimulantes. Los bioestimulantes son mensajeros bioquímicos que regulan el desarrollo normal de la planta, algunos le ayudan a detectar si el ambiente es favorable o no y, además, regulan su crecimiento y diferenciación de tejido, pues dictan el momento oportuno para su crecimiento y maduración. Los principales grupos de bioestimulantes son: auxinas, citocininas y giberelinas (Amarjit, 2000; García-Martínez, Cruz, Larqué-Saavedra y Soto, 2002). De manera general, se ha sugerido que durante el composteo se influye en la dinámica poblacional de los microorganismos generadores de la composta, lo que promueve la presencia de compuestos similares a los bioestimulantes como, por ejemplo, auxinas y giberelinas (García-Martínez *et al.*, 2002). Por otra parte, algunas fracciones húmicas han demostrado estimular el desarrollo y crecimiento vegetal, por lo cual también pueden ser consideradas como bioestimulantes (Kowalczyk y Sandberg, 2001; Canellas, Olivares, Okorokova-Facanha y Facanha, 2002).

Un bioestimulante es definido por sus efectos, por lo que hace, y no por lo que es, puesto que la categoría incluye una gran diversidad de sustancias. La palabra bioestimulante sugiere "estimulación del crecimiento", pero estas sustancias hacen mucho más que eso. La tolerancia al estrés, la sequía y la resistencia a las enfermedades son quizá los bene-

ficios más importantes que proporcionan los bioestimulantes, pero también estimulan el crecimiento de la raíz y promueven la actividad antioxidante, y aún falta estudiar muchos otros aspectos sobre su actividad, identificación y caracterización.

## Objetivo

Extraer, identificar y evaluar la presencia y actividad biológica de al menos un bioestimulante indólico presente en muestras de composta.

## Metodología

Se emplearon muestras de composta comercial Hum Ecol (HE), fertilizante orgánico, producto agrícola elaborado por Rubén Zepeda Piña para Comercializadora Amauta: Boyeros, Texcoco, Estado de México, México. Todos los estándares utilizados (auxinas) durante el experimento fueron grado reactivo, Sigma Chemical Co. (St. Louis Missouri, USA). Los reactivos y disolventes empleados fueron grado analítico (J. T. Baker).

La muestra de composta se secó a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a realizar el análisis de bioestimulantes, para ello, se pesaron 200 g de composta seca, se adicionaron 400 ml de metanol al 80% (v/v); se agitó la mezcla durante una hora y luego se envasó en un frasco ámbar, que se selló, etiquetó y guardó en refrigeración, aproximadamente a 4 °C y en oscuridad por 24 horas. Transcurridas las 24 horas, se homogenizó la mezcla y luego se filtró empleando papel Whatman número 40, para remover la fracción sólida y obtener un extracto metanólico lo más limpio posible y libre de impurezas. Se llevó a cabo una purificación preliminar que consistió en pasar el extracto metanólico por una columna de cromatografía, empleando columna Adsorbex LiChrolut RP-18 (Merck KgaA, Germany), columna para extracción en fase sólida, empacada con sílicageles sintéticos. El extracto metanólico obtenido se concentró en un rotavapor, a 35 °C y presión reducida (vacío). El extracto acuoso que se obtuvo se procesó con la metodología establecida por García-Martínez (1997), empleando solventes orgánico acuosos. Posteriormente, se utilizó cromatografía en capa fina y así se obtuvo un extracto listo para su análisis y evaluación.

Al extracto de composta purificado, se le realizaron tres análisis: identificación preliminar, mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC); identificación final, determinando su estructura mediante infrarojo (IR), y sometimiento a bioensayos específicos para establecer si poseía actividad.

Para la cromatografía en capa fina (TLC), se elaboraron cromatoplasmas de vidrio de 20 x 20 cm, impregnadas con Sílica Gel Merck 60F254, de aproximadamente 2 mm de grosor; como estándar comparativo, se emplearon soluciones de ácido-3-indol acético. La cromatografía se desarrolló a temperatura ambiente empleando como fase móvil (eluyente) una mezcla de solventes que contenía acetato de etilo, cloroformo y ácido acético con una relación en volumen de 90:30:6. El cromatograma obtenido se secó a temperatura ambiente y en el interior de la campana de extracción durante 4 horas, después se marcaron las bandas que correspondían por similitud al de los estándares y, una vez marcadas las zonas, se realizó un raspado con ayuda de una espátula y se colocó la mezcla sílica-extracto en un matraz erlenmeyer de 25 ml, adicionando 10 ml de una solución de cloroformo:metanol (9:1) hasta cubrir toda la mezcla. Una vez cubierta se mezcló perfectamente todo y se mantuvo en reposo durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se filtró la mezcla pasándola por un embudo de vidrio con papel Whatman número 1. El extracto purificado obtenido se concentró en un rotavapor, sin presión y a una temperatura de 50-60 °C hasta sequedad, y así se consiguió el extracto purificado de bioestimulantes. Los extractos purificados se envasaron en viales de vidrio color ámbar de 5 ml, se etiquetaron y el exceso de metanol se evaporó empleando una corriente de nitrógeno gaseoso; los frascos se almacenaron a una temperatura de 5 °C previa identificación parcial, mediante HPTLC, y análisis, mediante FT-IR o bioensayos.

Para la HPTLC, se emplearon cromatoplasmas de vidrio de 5 x 5 cm, impregnadas con Sílica Gel 60F254, marca Merck; otra vez se colocaron dos nuevas bandas, correspondientes a la referencia o estándar y al extracto purificado. La cromatografía se desarrolló a temperatura ambiente empleando como fase móvil (eluyente) 5 ml de una mezcla de solventes que contenía acetato de etilo, cloroformo y ácido acético con una relación en volumen de 15:5:1; posteriormente, se determinó el  $R_f$  correspondiente a cada una de las muestras y se marcaron las zonas específicas en donde el valor de  $R_f$  de extracto purificado fuera similar al del estándar utilizado.

La caracterización o identificación del extracto purificado de composta se realizó mediante el análisis de la muestra empleando un espectrofotómetro de infrarrojo con transformadas de Fourier FT-IR modelo 1600 Perkin Elmer, en la región de 4400-450  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando tabletas de KBr.

Para evaluar la actividad biológica del extracto purificado, se emplearon los bioensayos de la inhibición de la elongación de la raíz de *Lepidium sativum*, *Triticum aestivum* y *Amaranthus hybridus* (García-Martínez *et al.*, 2002; Cooper *et al.*, 1998; Maich *et al.*, 2003; Canellas y Facanha, 2004; Slavik, 2005). Estos bioensayos fueron seleccionados, de acuerdo con la respuesta rápida que presentan y su selectividad (Audus, 1972); se desarrollaron bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y luz, para obtener un resultado lo más exacto posible y que no fuera consecuencia de factores ajenos a la actividad del extracto purificado obtenido o los estándares empleados en la comparación. Se seleccionaron 200 semillas, que se lavaron y desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio comercial (cloralex) al 5% v/v con agua destilada durante 5 min. Una vez limpias y desinfectadas, las semillas se sumergieron en agua durante 2 horas, aproximadamente. Transcurrido este tiempo, las semillas se pusieron en charolas, en las que previamente se colocó un soporte de papel filtro humedecido con agua destilada hasta saturación, todas las semillas se colocaron con la misma orientación. La germinación se realizó en un cuarto oscuro, dentro de una cámara con humedad constante, y se regaron cada 24 horas con agua destilada. Una vez que las raíces alcanzaron una longitud aproximada de 0.5 cm, se realizó una selección homogénea de semillas con raíces, y éstas se transfirieron a cajas petri de 20 cm de diámetro, donde se les aplicaron varios tratamientos.

Las soluciones para los tratamientos se prepararon de la siguiente manera: un stock de una solución de ácido-3-indol acético a una concentración de  $10^{-4}$  M con agua destilada, a partir de la cual se realizó un gradiente de concentraciones de  $10^{-4}$  a  $10^{-12}$  M. Una vez listas las concentraciones del estándar, el extracto purificado se resuspendió en 2 ml de etanol y se aforó a 10 ml con agua destilada. Preparadas las disoluciones, los tratamientos se desarrollaron de la siguiente forma: a nueve cajas petri de 20 cm de diámetro, se les colocó un disco de papel filtro Whatman número 40 de poro grueso, posteriormente se adicionaron 10 ml de cada una de las soluciones preparadas para obtener así los

tratamientos para el estándar, un testigo con agua destilada y un último tratamiento con el extracto purificado de composta. Las cajas petri, con los tratamientos, se taparon para reducir la evaporación y, ya preparadas, se incubaron en la cámara de ambiente controlado a 23 °C. Después de 72 horas, se determinó la longitud de la radícula de las plántulas y se obtuvieron los datos correspondientes a la longitud del control o testigo (agua destilada) y a los diferentes tratamientos de AIA y el extracto purificado de composta. Con estos datos se obtuvo el cociente de longitud del tratamiento/ longitud del control y se graficó el promedio a partir de los valores obtenidos. Con base en estos resultados, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y, posteriormente, una prueba de Duncan para determinar si existía diferencia significativa entre los tratamientos –empleando el software Statistical Analysis System version 6 (SAS Institute, 1989)– y si el extracto purificado presentaba evidencia de actividad biológica similar al estándar (García-Martínez, 1997).

## Resultados

Diversas publicaciones han reportado el uso de metodologías similares a la empleada en esta investigación, pero actualmente se está tratando de entender los fenómenos que ocurren entre algunas fracciones del suelo y los cultivos, y eso ha abierto un nuevo campo de investigación en esta área. Sin embargo, esta idea no es nueva. Durante la primera década del siglo pasado, Bottomley planteó la hipótesis de la presencia de sustancias promotoras del crecimiento en los suelos, pero fue hasta 1973 cuando O'Donnell propuso que en la fracción húmica del suelo era la responsable de estos efectos, y describió la presencia de sustancias con actividad similar a la de los bioestimulantes. Esta última hipótesis despertó gran interés y sirvió como base para una gran cantidad de investigaciones que son el sustento de nuestros objetivos (García-Martínez 1997).

Obtenidos los datos de  $R_f$  del análisis por HPTLC, se procedió a realizar un análisis de varianza (ANOVA) con ellos, también se realizó una prueba de Duncan para determinar si existía diferencia significativa entre las medias de los datos de los  $R_f$ , para la identificación se observó que no existía diferencia significativa ( $p=0.05$ ) para los datos de las muestras del extracto purificado y el estándar empleado, lo cual indicaba que en estas muestras se encontraba un compuesto similar al estándar empleado.

En los bioensayos de amaranto y trigo (figuras 1 y 2), se puede observar que a concentraciones de  $10^{-10}$  M, o menor, existe un efecto casi nulo de la inhibición en el crecimiento de la raíz de *Amaranthus hybridus*, y que este efecto inhibitorio se marca de sobremanera a concentraciones de  $10^{-8}$  M, o mayor.

El análisis estadístico mostró que no existe diferencia significativa ( $P=0.05$ ) entre el extracto de composta purificado y la concentración de  $10^{-8}$  M del AIA, de tal forma que podemos decir que el bioensayo mostró que el extracto purificado de composta posee actividad biológica similar al AIA.

Figura 1. Bioensayo de la inhibición de la raíz de *Amaranthus hybridus*, después de 72 horas

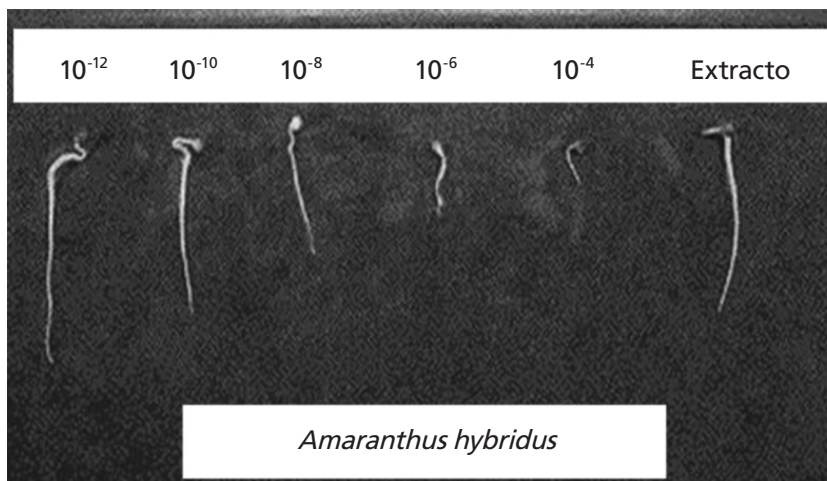
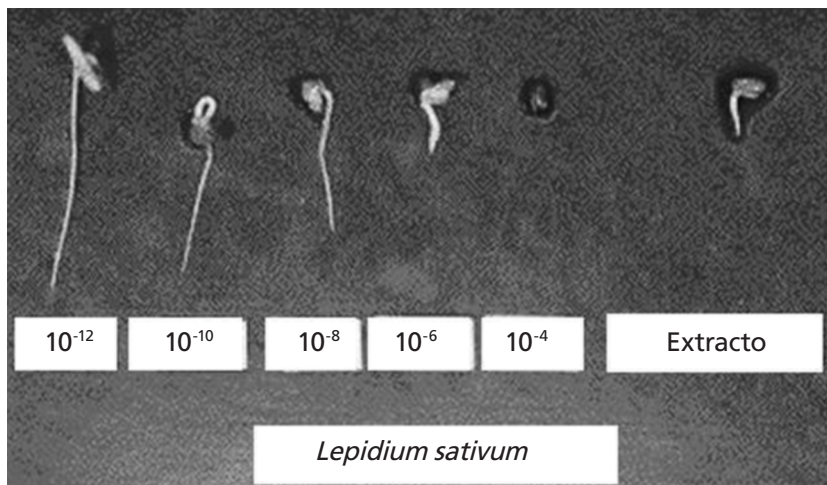


Figura 2. Bioensayo de la inhibición de la raíz de *Lepidium sativum*, después de 72 horas



En el bioensayo de *Lepidium sativum*, los datos recopilados se procesaron mediante un análisis de varianza y una prueba de Duncan para determinar si existía una diferencia importante entre las medias de los tratamientos. El análisis estadístico arrojó evidencia significativa ( $P=0.05$ ) entre los tratamientos del extracto purificado de composta y la concentración de  $10^{-6}$  Molar de estándar (Figura 3). De tal forma, podemos decir que el bioensayo demostró que el extracto purificado de composta contiene un compuesto con actividad biológica similar al AIA. Finalmente, el espectro de infrarrojo que se obtuvo (Figura 4) muestra la presencia de los principales grupos funcionales pertenecientes a la estructura de un indol (Figura 5).

Figura 3. Bioensayo de la inhibición de la raíz de *Triticum aestivum*, después de 72 horas

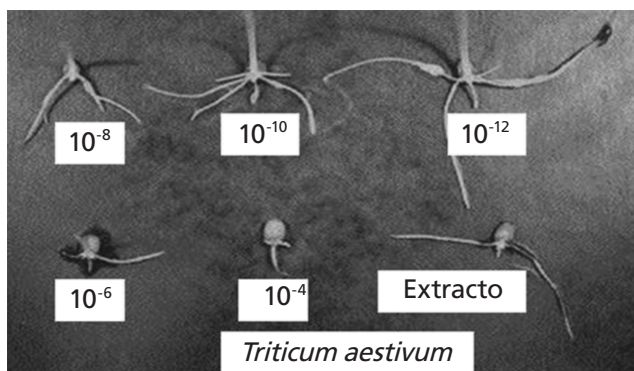


Figura 4. Espectro de infrarrojo del extracto purificado de composta

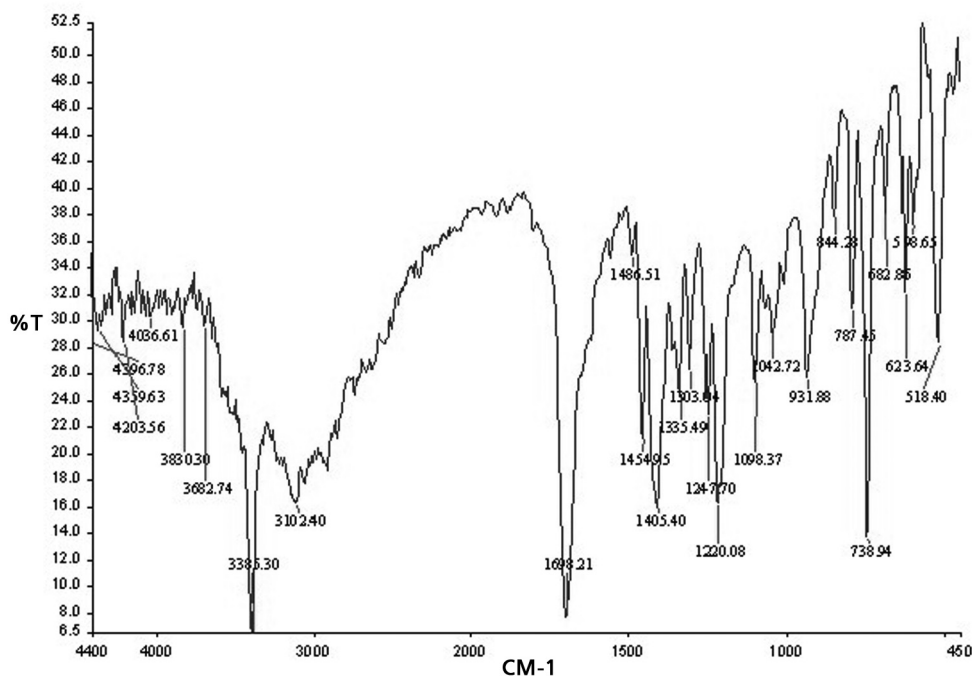
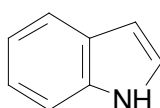


Figura 5. Estructura química del indol



## Discusión


En la literatura al respecto, se han reportado resultados similares, pero con muestras diversas. En este contexto, los resultados de los bioensayos concuerdan con lo reportado para muestras de suelo que presentan actividad de auxina (Slavik, 2005). Por otra parte, Atiyeh *et al.* (2002) encontraron que la aplicación de composta madura repercute directamente en el crecimiento vegetal, asumiendo que la fracción húmica de la composta posee también actividad similar a una auxina; a la par, la promoción de la elongación de la raíz es un bioensayo comúnmente empleado para determinar la actividad biológica de bioestimulantes y compostas (Nethra *et al.*, 1999, Canellas *et al.*, 2002, García-Martínez *et al.*, 2002).

En cuanto al análisis de HPTLC, éste mostró suficiente evidencia para determinar que en nuestra muestra de composta se encuentra un compuesto con peso molecular similar al del ácido-3-indol acético. Este resultado es com-

parable con el encontrado por Shui-Wen, Chun-Chia y Min-Chao (2003) en muestras de compostas, en las cuales encontró no sólo semejanza con los compuestos indólicos, sino con ácidos húmicos.

Con el análisis de FT-IR de el extracto de composta purificado encontramos espectros que al ser comparados con los reportados por Morzyk-Ociepa, Michalska y Pietraszko (2004a,b), quienes analizaron la estructura de compuestos indólicos para su caracterización. Se encontró similitud en las bandas correspondientes al grupo indol, que es la base no sólo del ácido-3-indol acético, sino también del ácido giberélico y otros bioestimulantes que poseen esta base estructural indólica, de acuerdo con lo reportado por Kowalczyk y Sandberg (2001), García-Martínez *et al.* (2002) y Shui *et al.* (2003). Esto nos permite dejar abierta la posibilidad a la presencia de otros compuestos indólicos similares a otros bioestimulantes, y el empleo de técnicas para la caracterización de éstos, como la espectrometría de masas y la cromatografía de gases y líquidos.

## Conclusión

El extracto purificado de composta contiene bioestimulantes indólicos, cuya base estructural es el grupo indol. Además, este extracto purificado presenta un peso molecular y actividad biológica similar al indol más representativo de los reguladores del crecimiento vegetal: el AIA. Ello nos permite concluir que las muestras de composta Hum Ecol contienen al menos un bioestimulante indólico, similar al ácido-3-indol acético, y que éste es uno de los elementos que influye en el crecimiento de los cultivos en los que se incorporan compostas.\* 

## Referencias

- Audus, L. J. (1972). *Plant Growth Substances*. Great Britain: Leonard Hill Books.
- Amarjit, S. B. (2000). *Plant Growth Regulators in Agriculture and Horticulture*. USA: Food Products Press.
- Atiyeh, R. M., Edwards, C. A., Subler, S. & 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.
- Atiyeh, R. M., Lee, S., Edwards, C. A., Arancon, N. Q. & Metzger, J. D. (2002). The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Bioresource Technology*, 84, 7-14.
- Buckerfield, J. C., Flavel, T., Lee, K. E. & Webster, K. A. (1999). Vermicompost in solid and liquid form as a plant-growth promoter. *Pedobiología*, 43, 753-759.
- Canellas, L. P. & Facanha, A. R. (2004). Chemical nature of soil humified fractions and their bioactivity. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 39 (3), 233-240.
- Canellas, L. P., Olivares, F. L., Okorokova-Facanha, A. L. & Facanha, A. R. (2002). Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology*, 130, 1951-1957.
- Cooper, R. J., Liu, Ch. & Fisher, D. S. (1998). Influence of humic substances on rooting and nutrient content of creeping bentgrass. *Crop Science*, 38, 1639-1644.
- García-Martínez, I., Cruz, F., Larqué-Saavedra, A. & Soto, M. (2002). Extraction of auxin-like substances from compost. *Crop Research*, 24, 323-327.
- García-Martínez, I. (1997). *Análisis e identificación de sustancias probables reguladores del crecimiento vegetal*. Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Kowalczyk, M. & Sandberg, G. (2001). Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in arabidopsis. *Plant Physiology*, 127, 1845-1853.
- Maich, R., Lorello, I. M., Torres, L. E., Rolando, R. & Torres, L. (2003). Efecto de la inhibición de semillas de trigo en extracto de suspensión de compost maduro sobre el vigor inicial de las plántulas. *Agriscientia*, 20, 89-94.
- Morzyk-Ociepa, Michalska, D. & Pietraszko, A. (2004a). Structures and vibrational spectra of indolecarboxylic acids. Part I. Indole-2-carboxylic acid. *Journal of Molecular Structure*, 688, 19-86.
- Morzyk-Ociepa, B., Michalska, D. & Pietraszko, A. (2004b). Structures and vibrational spectra of indolecarboxylic acids. Part II. 5-Methoxyindole-2-carboxylic acid. *Journal of Molecular Structure*, 688, 87-94.
- Nethra, N. N., Jayaprasad, K. V. & Kalem, R. D. (1999). China aster [*Callistephus* (L.) Ness] cultivation using vermicompost as organic amendment. *Crops Research*, 17, 209-215.
- SAS Institute (1989). *SAS/STAT User's guide*, ver. 6. USA: SAS Institute Inc.
- Shui-Wen, Ch. Ch, Chun-Chia, H. & Min-Chao, W. (2003). Analytical and spectroscopic characteristics of refuse compost-derived humic substances. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 1 (1), 62-71.
- Slavik, M. (2005). Production of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) seedlings on substrate mixes using growth stimulants. *Journal of Forest Science*, 51 (1), 15-23.
- Tchobanoglous, G., Theisen, H. & Vigil, S. (1993). *Integrated Solid Waste Management*. Singapore: McGraw-Hill International Editions.
- Wilson, D. P. & Carlile, W. R. (1989). Plant growth in potting media containing worm-worked duck waste. *Acta Horticulturae*, 238, 205-220.

\*Los autores agradecen a la USB el apoyo recibido para el desarrollo de esta investigación, así como al Cosnet por el financiamiento del proyecto 1031.03-P.