

Aislamiento de Cepas Nativas Microbianas con Actividad Celulolítica de un Proceso de Compostaje

Recibido para evaluación: 26 de Septiembre de 2003
Aceptación: 24 de Noviembre de 2003
Recibido versión final: 03 de Diciembre de 2003

Marisol Jaramillo G.¹
Orlando Simón Ruiz V.²
María del Socorro Yepes P.³
Olga Inés Montoya C.⁴

RESUMEN

El aislamiento, selección, adaptación y manipulación de microorganismos nativos, procedentes de desperdicios orgánicos, es una alternativa para evitar la acumulación y desaprovechamiento de estos materiales indeseables, porque sirven como fuente de obtención de cepas microbianas potencialmente productoras de enzimas industriales y/o a su vez como sustrato, para que estos mismos organismos puedan transformarlos en compost o abono orgánico. En el presente trabajo se aislaron, purificaron y evaluaron 39 cepas nativas de microorganismos con potencial actividad celulolítica, a partir de desechos orgánicos del sector urbano y rural, procedentes de la Planta de Compostaje del municipio de Marinilla, Antioquia. Ellos fueron previamente seleccionados y posteriormente sometidos a una degradación aerobia o compostaje.

Las cepas microbianas se aislaron en un medio selectivo con carboximetilcelulosa (CMC), de las fases mesófila, termófila, enfriamiento y maduración del proceso de compostación. El 82% de las colonias obtenidas fueron identificadas tentativamente como *Bacillus* por su morfología y por su reacción a la coloración de Gram. La población fúngica únicamente se evidenció durante la fase de enfriamiento. Posteriormente se procedió a evaluar de forma cualitativa, la potencial actividad celulolítica en medio sólido a través de la coloración con rojo Congo, con el que se evaluó la actividad β -endoglucanasa a través de la formación de zonas clarificadas. Dicha tinción se hizo en dos medios con CMC con y sin glucosa. Se observó que el 33.3% de los organismos aislados produjeron la enzima en ambos medios, sin embargo el 25.6% de los microorganismos, no evidenciaron la producción de ésta enzima, y sólo el 15.8% no requirieron el inductor para producirla.

PALABRAS CLAVE: Compostaje, Microorganismos Celulolíticos, Endoglucanasas, Rojo Congo

ABSTRACT

The isolation, selection, adaptation and handling of native microorganisms, coming from organic waste, is an alternative to avoid the accumulation and the lack of the proper use of these undesirable materials. This organic waste is a source for obtaining microbial strains which are potentially producers of industrial enzymes and, at the same time, it works as substrate so that these organisms can transform it into compost or organic manure. In this work, 39 native strains of microorganisms with potential cellulolytic activity, coming from the organic waste of the urban and rural sector, from the Compostage Plant of Marinilla (Antioquia) municipality, were isolated, evaluated and purified. The waste was previously selected and then submitted to an aerobic degradation or compostage.

The microbial strains were isolated in a selective medium with carboxymethyl cellulose (CMC), of the phases mesophile, thermophile, cooling and maturation of the compost process. Eighty-two percent (82%) of the obtained colonies were identified, in principle, as *Bacillus*, because of their morphology and their reaction to the Gram coloration. The fungi population was seen only during the cooling phase. Then, the potential cellulolytic activity was evaluated qualitatively in a solid medium with the Congo Red coloration, with which the β -endoglucanase activity was evaluated through the formation of clarified zones. Such staining was applied in two mediums with CMC with and without glucose. It was observed that 33.3% of the isolated organisms produced the enzyme in both mediums; however, 25.6% of microorganisms did not show the production of this enzyme, and only 15.8% did not require the inducer to produce it.

KEY WORDS: Composting, Microorganisms Cellulolytic, Endoglucanases, Red Congo

1. Ingeniera Química candidata a Magíster en Biotecnología, Docente Ocasional Escuela de Química.

2. Químico Magíster en Ciencia y Técnicas del Carbón, Profesor Asociado Escuela de Geociencias

3. Químico Magíster en Ciencias Químicas, Profesora Asistente de la Escuela de Química

Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

4. Magíster en Microbiología, Profesora de la Escuela de Biociencias.

Grupo de Investigación Biotecnología Microbiana.

Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

mjarami1@unalmed.edu.co

1. INTRODUCCIÓN

Los desechos orgánicos, sin importar su procedencia son fuente de contaminación ambiental. Estos desechos están compuestos de material putrescible como desperdicios de vegetales y frutas, que en la mayoría de los casos son biodegradables; esta biotransformación se da en forma natural, pero también pueden inducirse por medio de tecnologías modernas en las cuales se utilizan microorganismos de acción dirigida (Jagnow y Dawid, 1999).

El compostaje es un proceso dinámico donde se combinan las actividades metabólicas de una gran variedad de poblaciones microbianas como bacterias, hongos y actinomicetos, que actúan sobre sustratos tales como desechos orgánicos de origen doméstico, agrícola e industrial, y los convierten en productos de mayor valor agregado que se utilizan como abonos orgánicos o compost (Sharman et al., 1999). Sin embargo, estos son procesos que aunque ocurren en forma natural, son muy lentos, generándose otro problema debido a la acumulación de los desechos por periodos largos de tiempo (Neuhauser, et al., 1988). Las soluciones que se han dado son muy diversas, pero muchas de ellas han sido a su vez muy cuestionadas, porque se constituyen en un nuevo problema que se debe resolver en un corto plazo. Una alternativa que ha tomado mucha fuerza en el mundo, ha sido el empleo de microorganismos celulolíticos que aceleran la degradación de los desechos ricos en celulosa, por medio de sus enzimas (Bengtsson et al, 1998).

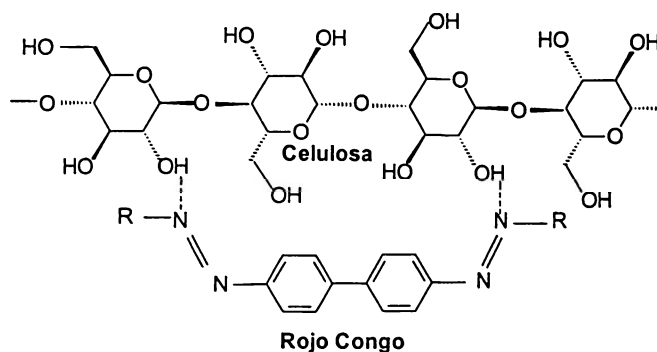
A escala mundial, son los países desarrollados quienes más se han interesado en solucionar los problemas que generan los residuos sólidos, convirtiéndose en prioridad para ellos, ya que existen legislaciones sobre manejo adecuado de tales residuos, para que no causen impactos negativos sobre el ecosistema; es por ello que en dichos países, las plantas de compostaje son comunes (Mitchell, 1993). Simultáneamente cuentan con laboratorios microbiológicos de mucho prestigio, que tienen a su cargo la investigación de la microbiota aislada de los bioprocesos para identificarla, reproducirla y otorgarle propiedades especiales que garanticen una degradación óptima de los desechos.

En Colombia el compostaje se realiza a pequeña escala, es decir, no se ha explotado económicamente y mucho menos para disminuir el impacto ambiental que generan los desechos.

En el municipio de Marinilla, Antioquia, se han adelantado programas de reciclaje, con buena acogida por parte de sus habitantes; esto ha facilitado el establecimiento de un programa de compostación que aún se realiza en forma natural. Es por lo tanto necesario aislar nuestras propias cepas microbianas, y definir las condiciones óptimas de sus actividades celulolíticas para beneficio de la región, porque ellas representan una alternativa dentro de las denominadas tecnologías limpias y económicas.

En el presente trabajo, se aislaron cepas nativas celulolíticas aerobias durante las diferentes etapas de un proceso de compostaje de residuos orgánicos, provenientes de los sectores rural y urbano del municipio de Marinilla, Antioquia.

La evaluación de la actividad celulolítica cualitativa se hizo mediante la coloración del rojo Congo. Con ello se pretendió determinar cuales de los microorganismos aislados, presentaban la capacidad para excretar al medio las endo- β -glucanasas, enzimas que hidrolizan en forma aleatoria los enlaces β - glucosídicos al interior de la molécula de celulosa. Se empleó la carboximetilcelulosa como fuente de carbono en los medios que se utilizaron para la selección. La siguiente reacción representa la forma de acción del colorante sobre los glicósidos:



2. MATERIALES Y METODOLOGÍA

2.1. Toma de Muestra

El muestreo de los residuos orgánicos se realizó en la Planta de Abonos del municipio de Marinilla, Antioquia. En este lugar los desechos orgánicos provenientes del sector doméstico y rural, son previamente organizados en camas, para facilitar su manipulación en el momento de hacer los volteos periódicos, procedimiento de aireación necesario para la obtención de un compost de buena calidad (Tchobanoglous, 1998)

Las muestras en cada una de las fases del proceso del compostaje (mesófila, termófila, enfriamiento y maduración), se tomaron del centro de la cama, de acuerdo a un diagrama de temperatura elaborado en la Planta, en el que previamente se habían identificado las diferentes etapas. La primera muestra correspondió al material fresco que se tomó a temperatura ambiente (mesófila), la segunda muestra (termófila) tuvo una diferencia de cuatro días con respecto a la primera fase (mesófila), la tercera (enfriamiento) de 16 días con respecto a la segunda y la cuarta (maduración), 26 días con respecto a la tercera y 46 días con respecto al tiempo cero. La cantidad de muestra recogida fue de un kilo. La Tabla 1 presenta las diferentes temperaturas de muestreo y su relación con la temperatura ambiental. Es importante anotar que las pruebas de temperatura se hicieron a la misma hora (11:30 a.m.).

Fase	T _{ambiente} °C	T _{muestra} °C
Mesófila	19.0	19.0
Termófila	20.9	53.4
Enfriamiento	16.0	41.2
Maduración	20.0	20.0

Tabla 1.
Condiciones de temperaturas de las fases

2.2. Tratamiento de las Muestras

Se procedió de acuerdo al método de recuento de diluciones sucesivas (Collins y Lyne, 1989): 10 gramos de la muestra se diluyeron en 90 ml de agua destilada, correspondiendo a la dilución 10^{-1} . De esta solución se tomó un mililitro (1 ml) y se le adicionaron 9 ml de agua destilada, esta fue la dilución 10^{-2} . Este proceso se repitió sucesivamente hasta obtener las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} , partiendo siempre de la última solución preparada.

2.3. Inoculación, Aislamiento y Purificación

Con el fin de obtener los microorganismos típicos celulolíticos que se desarrollaron en el compostaje, se procedió a inocular por duplicado, las diluciones de las muestras preparadas, utilizando un medio de cultivo selectivo a base de carboximetilcelulosa (CMC), con la siguiente composición: 0.5g de CMC, 0.1g de NaNO_3 , 0.1g de K_2HPO_4 , 0.1g KCL, 0.05g de extracto de levadura, 0.05g de MgSO_4 , 0.1g de glucosa, 100 ml de H_2O destilada y 1.7% p/v de agar (Apun, 1995).

- Para hongos, las tres primeras diluciones 10^{-1} a la 10^{-3} , se inocularon e incubaron a temperatura ambiente; se observó su crecimiento entre los días siete (7) y ocho (8).
- Para bacterias y levaduras, las diluciones 10^{-4} a la 10^{-7} se inocularon e incubaron durante 24 horas, de acuerdo a las temperaturas de las fases en las cuales se tomó la muestra.

Finalmente, los microorganismos aislados se purificaron siguiendo el método de agotamiento en placa (Collins y Lien, 1989) y utilizando el mismo medio selectivo con CMC, hasta obtener un solo tipo de colonia por microorganismo aislado.

2.4. Evaluación Cualitativa de la Actividad Celulolítica

Una vez aisladas y purificadas las cepas microbianas, se procedió a escoger las que presentaron actividad celulolítica, mediante la prueba de coloración del rojo Congo, que permite visualizar la CMC remanente en el medio, por la formación de halo alrededor de la cepa, el cual se puede medir. Con este colorante se determinó la actividad celulolítica β -1,4-glucosidasa del complejo de celulasas.

Con el fin de estimular el crecimiento microbiano, se inocularon e incubaron las cepas en medio CMC líquido por 24 horas. Luego se sembraron e incubaron en medio CMC sólido durante 48 horas. Para visualizar las zonas de hidrólisis o clarificación en el medio, se añadió a cada cultivo microbiano, una solución de rojo Congo al 0.1% p/v, por 15 minutos y para revelar las zonas, se lavó con una solución de cloruro de sodio 1M durante 10-15 minutos, e inmediatamente se midió el diámetro del halo alrededor de la colonia (Magnelli et al., 1997).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Microorganismos Aislados en las Diferentes Fases del Compostaje

El compostaje como todo proceso dinámico biológico, presenta diferentes poblaciones microbianas, de modo que en cada momento se generan y multiplican más rápidamente unas poblaciones con respecto a otras; cuando las condiciones dejan de ser idóneas para una determinada población, sus miembros mueren y ceden su lugar a otras nuevas (Stutzenberger, et al., 1970). Por esto dependiendo de la fase del proceso, se pueden encontrar diferentes especies microbianas como las que se describen en este trabajo.

En la Tabla 2 se reportan los microorganismos aislados en las diferentes fases del compostaje y en la Figura 1 se representa esta misma información. La mayoría de las colonias fueron identificadas tentativamente como *Bacillus* por su morfología y por su reacción a la coloración de Gram. Este resultado fue comparable al reportado por McDonald et al. (1998).

Tabla 2.
Cepas aisladas en las diferentes
fases del compostaje

Microorganismo	Mesófila	Termófila	Enfriamiento	Maduración	Total
Bacilo Gram +	1	9	3	7	20
Bacilo Gram -	2	2	1	3	8
Bacilo Gram variable	1	0	2	1	4
Coco Gram +	1	0	0	0	1
Levaduras	2	0	0	0	2
Hongos	0	0	4	0	4
Total	7	11	10	11	39

Fase Mesófila

Esta primera fase se caracteriza comúnmente por la presencia principalmente de bacterias, debido a su gran capacidad para reproducirse y algunos hongos (Paul y Clark, 1990).

En esta investigación se encontró predominio de las bacterias del género bacilos (de siete microorganismos aislados, cuatro corresponden a éste género). Los organismos presentes en esta etapa se caracterizan por su capacidad para degradar los residuos ricos en carbohidratos fácilmente degradables, bajo condiciones de temperatura ambiente, requisito muy importante por su termosensibilidad (Van Elsas et al, 1997)

Fase Termófila

El rápido aumento de la microbiota y el alto consumo de carbohidratos sencillos de la fase mesófila, induce a un incremento en la temperatura del sustrato (desechos orgánicos). En la literatura se reporta que los organismos mesófilos son desplazados por las condiciones que se generan en el medio y los termófilos se activan para degradar pectinas, hemicelulosa y celulosa (Jagnow y Dawid, 1999).

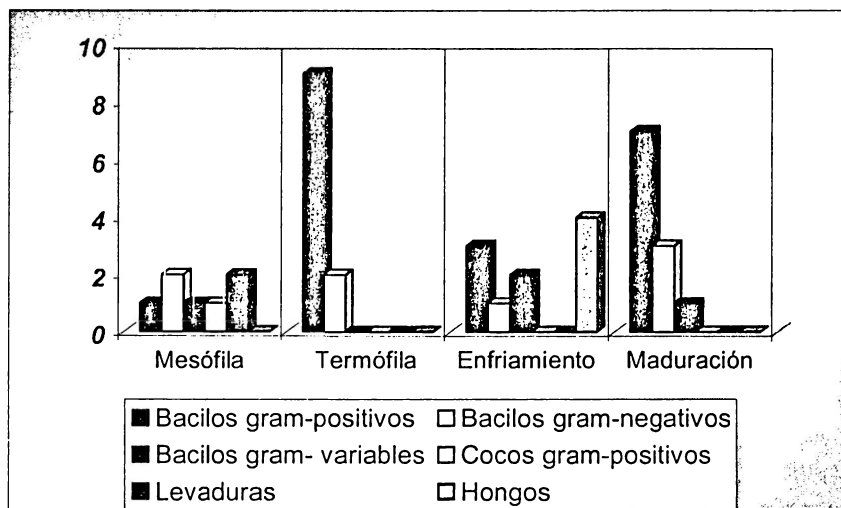


Figura 1.
Microorganismos aislados durante

Se observó en esta etapa, la presencia de un número mayor de bacterias gram-positivas (nueve de 11 cepas aisladas) que superaron a las gram-negativas (dos). No hubo evidencia de la presencia de hongos celulolíticos.

Fase de Enfriamiento

En esta fase la temperatura disminuye hasta llegar nuevamente a la del ambiente, y según estudios realizados, el proceso continúa gracias a organismos esporulados y actinomicetos (Herrmann y Shann, 1997).

Esta es la única fase donde se aislaron hongos (cuatro cepas). Su presencia seguramente contribuye o sinergiza la acción de los bacilos también presentes en esta etapa, donde aún se encuentran compuestos que hasta el momento no se habían podido degradar por completo, como son la celulosa y la lignina.

Fase de Maduración

Esta fase es de suma importancia porque la fitotoxicidad del compost se ha asociado con la inmadurez del producto, debido a la formación de ácidos orgánicos durante los primeros estados del proceso del compostaje (Benito et al, 2003).

Como en las demás fases, los bacilos fueron las especies dominantes, siete gram-positivos y tres gram-negativos.

Aunque en la literatura se reporta que en esta etapa abundan los hongos (Jagnow y Dawid, 1999), en este trabajo no se aislaron. Una explicación a este hecho es que se han agotado los sustratos celulolíticos en la fase anterior y el medio de cultivo que se utilizó para aislar los microorganismos, tenía como fuente de carbono carboximetilcelulosa. Así que los hongos que se aislaron previamente fueron celulolíticos y al agotarse la celulosa, ellos desaparecieron.

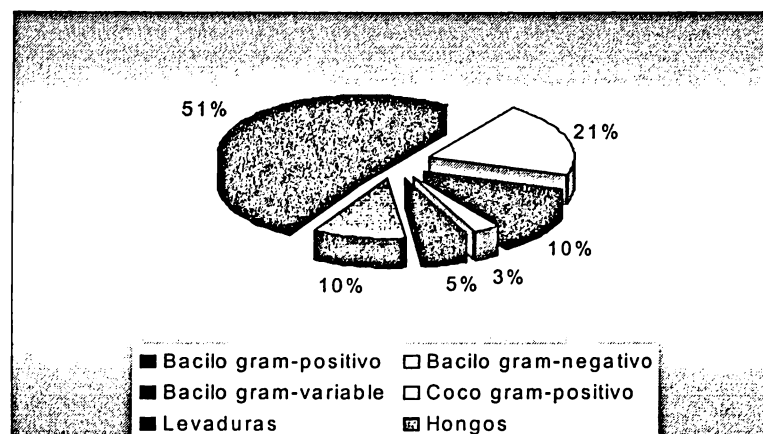
3.2. Porcentajes de Microorganismos Aislados

Las bacterias debido a su tamaño, entre 0.5 y 1.5 micras de ancho por 10 micras de largo, presentan una relación superficie/volumen muy alta, que les permite colonizar rápidamente los sustratos para metabolizarlos (Paul y Clark, 1990).

En esta investigación se aislaron 39 cepas microbianas y se observó que las bacterias del género *Bacillus* (32 cepas), siempre estuvieron durante todas las fases del proceso degradativo, representando el 82% de los microorganismos totales, 94.5% de las bacterias; además, el 50% de ellas, presentó formación de esporo. Los hongos representaron sólo el 15%, con una presencia modesta de levaduras, 5%. En la Figura 2 se ilustra esta información.

23

Figura 2.
Porcentajes de microorganismos
aislados



3.3. Actividad Celulolítica

Los microorganismos aislados se inocularon en medio CMC en ausencia y presencia de glucosa, para observar su comportamiento y poder comparar mejor sus actividades. La concentración de glucosa fue muy baja (1%) y su función no es precisamente servir de fuente de carbono, sino de estimulador (iniciador) de la actividad (Bhat, 2000).

La actividad celulolítica cualitativa se midió con el rojo Congo, con el que se pudo observar la actividad endoglucanasa a través de la formación de zonas clarificadas o halos.

En la Figura 3 se resumen los resultados obtenidos de la actividad celulolítica endoglucanasa de las cepas microbianas seleccionadas.

- Se analizó la actividad enzimática de cuatro bacilos, un coco y dos levaduras aislados en la fase mesófila. Sólo un bacilo y un coco gram-positivos, no exhibieron actividad, aunque fue evidente su habilidad para crecer en los medios selectivos (con CMC). De los dos bacilos gram-negativos encontrados, Meso 7 manifestó una gran capacidad celulolítica en presencia y ausencia de glucosa, y fue el único microorganismo mesófilo que mostró actividad en ausencia de glucosa, indicando una gran adaptación a cualquiera de los dos medios; además, su halo en el medio con glucosa fue el de mayor tamaño dentro de esta fase (2.7 cm). Es de destacar que ninguno de los bacilos gram-positivos producen endosporas.
- En la fase termófila, todos los microorganismos aislados fueron del genero *Bacillus*. Seis cepas no presentaron actividad celulolítica, la T9 y T10 además, se clasificaron como gram-negativas. Dos cepas, la T2 y T4, mostraron actividad celulolítica en el medio sin glucosa. Las cepas T1, T3 y T8, presentaron actividad en medios con y sin glucosa. Es importante destacar la cepa T1 por su capacidad para adaptarse a los medios utilizados, formando una zona de hidrólisis de 2.5 cm, en presencia o ausencia de glucosa. Podría decirse que estos microorganismos no requieren del monosacárido como inductor del proceso hidrolítico (Bhat y Bhat, 1997). Todos los bacilos gram-positivos fueron productores de endosporas. La formación de estas estructuras protectoras es el producto del acondicionamiento de los organismos a las condiciones térmicas que presenta esta fase (EL-Din et al., 2000).
- Todas las cepas de la etapa de enfriamiento, hidrolizaron la carboximetilcelulosa del medio: E1, E2 y E3 manifestaron su actividad en los medios con y sin glucosa, E5 y E6 (bacilos gram-positivos esporulados), requirieron del inductor, mientras que E4 no preciso de él.
- En la maduración, última fase del proceso, seis cepas Mad 1, Mad 3, Mad 6, Mad 8 (productores de endosporas), Mad 9 y Mad 10, degradaron la CMC en los dos medios probados, los bacilos formadores de esporo Mad 3 se distinguieron en su grupo, por presentar mayor capacidad de hidrólisis enzimática. Mad 4 y Mad 7, no evidenciaron actividad. Los bacilos gram-negativos de esta etapa, no manifestaron una actividad importante (Mad 5, Mad 7 y Mad 8), posiblemente por su mecanismo de acción para acceder a los nutrientes. Su membrana externa no es permeable a enzimas o a otras moléculas de

25

gran tamaño, de hecho una de sus principales funciones puede ser la de mantener determinadas enzimas que se hallan en el exterior de la membrana citoplasmática, evitando su difusión hacia el entorno. Estas enzimas se encuentran en una región denominada periplasma, por lo que no exhiben actividad celulolítica (Glazer y Nikaido, 1995).

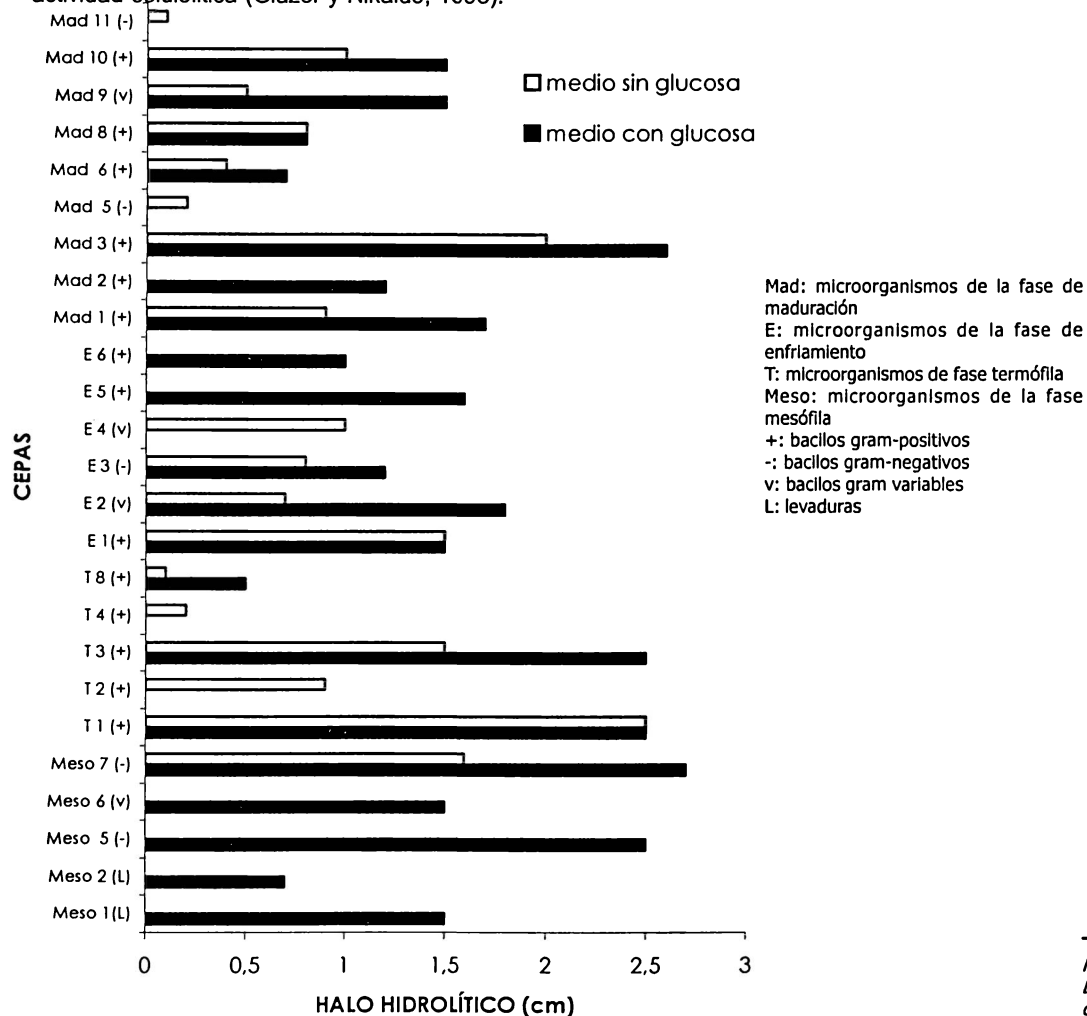


Figura 3.
Determinación de la actividad
celulolítica cualitativa

Al analizarse los resultados obtenidos durante todo el proceso de compostación, se observó que el mayor número de organismos celulolíticos fueron del género *Bacillus* gram-positivos. Sin embargo, el 25.6% de los organismos aislados, no evidenciaron actividad celulolítica. Posiblemente ocurrió una inactivación en el mecanismo de producción enzimática, debido a los sucesivos repiques a los que se sometieron o, son cepas que requieren de un período de adaptación mayor (Umikalsom et al, 1997).

4. CONCLUSIONES

Durante el proceso de compostaje se aislaron 39 cepas microbianas con potencial actividad celulolítica, observándose el predominio del género *Bacillus* (82%). El 50% de las cepas bacterianas tienen capacidad de formar endosporas.

Los *Bacillus* gram-positivos (51%) predominaron sobre los gram-negativos (21%); de estos últimos solamente uno (Meso 7), se reportó como celulolítico, mostrando una notable actividad tanto endo como exoglucanasa.

Los procesos de compostaje requieren de una acción concertada de diferentes especies

microbianas, donde cada una tiene una acción definida y en ocasiones complementaria o sinérgica. Por esto el estudio de los microorganismos que actúan en cada una de las fases de la biodegradación de los desechos celulolíticos, permite la selección de cepas con diferentes tipos de actividades celulolíticas, que pueden contribuir al aceleramiento de una etapa en particular, disminuyendo el tiempo de transformación.

Las cepas nativas microbianas celulolíticas aisladas del proceso de compostaje, presentaron actividad endoglucanasa. Estos aislamientos son el primer paso en la implementación de una tecnificación de los procesos de biorremediación, porque permiten identificar cada uno de los microorganismos involucrados, a los que luego se les pueden determinar las condiciones óptimas de desarrollo. Un posible cultivo a gran escala, se emplearía en el aceleramiento de la compostación.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dirección de Investigación Medellín, DIME, de la Universidad Nacional de Colombia, la cual financió este trabajo. Igualmente agradece a los Laboratorios de Microbiología Industrial y Venenos Naturales (Micotoxinas) donde se realizó esta investigación.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Apun, K.S. 1995. Practical Biotechnology: Cellulase production. National Centre for Biotechnology Education.
- Bengtsson, A.; Quednau, M.; Haska, G. y Nitzlen, P. 1998. Composting of oily sludge degradation, stabilized residues, volatiles and microbial activity. *Waste Manage Res.* 16, pp. 273 – 284.
- Benito, M.; Masaguer, A.; Moliner, A.; Arrigo, N. y Palma, R.M. 2003. Chemical and microbiological parameters for the characterisation of the stability and maturity of pruning waste compost. *Biol. Fertil.* 37, pp. 184 – 189.
- Bhat, M.K. y Bhat, S. 1997. Cellulose degrading and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances.* 15, pp. 583 – 620.
- Bhat, M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances.* 18, pp. 355 – 383.
- Collins, C.H. y Lyne, P.M. 1989. Métodos Microbiológicos. 5 ed. Zaragoza, Editorial ACRIBIA, 524 pp.
- EL-Din, B.; Attia, M. y Abo-Sedera, S.A. 2000. Field assessment of compost produced by highly effective cellulolytic microorganisms. *Biol. Fertil Soils.* 32, pp. 35 – 40.
- Glazer, A. y Nikaido, H. 1995. Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology. W.H. Freeman and Company, U.S.A. pp 662.
- Herrmann, R.F. y Shann, J.F. 1997. Microbial community changes during the composting of municipal solid waste. *Microbial ecology.* 33, pp. 78 – 85.
- Jagnow, G. y Dawid, W. 1999. Biotecnología Introducción con ejemplos modelos. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España. pp. 185 – 189.
- Magnelli, P.E. Martínez, A. y Mercuri, O.A. 1997. Método simple para determinar actividad celulolítica en hongos. *Argentina de Microbiología.* 29, pp. 210 – 214.
- McDonald, R.; Riley, P.W.; Sharp, R. J. y McCarthy, A. J. 1998. Survival of *Bacillus subtilis* – containing released into Mushroom compost. *Microbial ecology.* 36, pp. 51 – 59.
- Mitchell, R. 1993. Environmental microbiology. Ed Wiley – liss. U.S.A, pp. 361 – 363.
- Neuhauser, E.F.; Loehr, R.C. y Malecki, M.R. 1988. The potential of earthworms for managing sewage sludge. SPB Academic Publishing, The Hague, pp. 9 – 20.
- Paul, E.A. y Clark, F.E. 1990. Soil Microbiology and Biochemistry. Ed. Academic press. U.S.A.
- Sharma, S.; Mathur, R.C. y Vasudevan, P. 1999. Composting silkworm culture waste. *Compost Sci. Util.* 7 (2), pp. 74 – 81.
- Stutzenberger, F.J.; Kaufman, A.J. y Lossin, R.D. 1970. Cellulolytic activity in municipal solid waste composting. *Canadian Journal of Microbiology.* 16, pp. 553 – 560.
- Tchobanoglous, G., Theisen, H. y Vigil, S. 1998. Gestión Integral de Residuos Sólidos. Vol II. Mc Graw Hill.
- Umikalsan, M.S.; Ariff, A.B.; Shamsuddin, Z.H.; Tong, C.C.; Hassan, M.A.; Karim, M.I.A. 1997. Production of cellulase by a wild strain of *Chaetomium globosum* using delignified oil palm empty-fruit bunch fibre as substrate.