

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin



**Vliv různých druhů bioodpadů
na parametry vermikompostování**

.....
doktorská disertační práce

Autor: **Ing. Tereza Hřebečková**

Školitel: **doc. Ing. Aleš Hanč, Ph.D.**

Praha 2021

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou disertační práci „Vliv různých druhů bioodpadů na parametry vermikompostování" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího disertační práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené disertační práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13.1.2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala všem, kteří mi pomáhali, v první řadě hlavně panu doc. Ing. Alešovi Hančovi, Ph.D. za vedení mé disertační práce a spolupráci na publikacích. Dále bych ráda poděkovala mému manželovi za podporu a mým dětem, že byly tak hodné a nechaly mě práci dokončit.

Obsah

1. Úvod	6
2. Literární přehled	7
2.1. Kompostování	7
2.2. Vermikompostování	10
2.2.1. Žížaly	13
2.2.2. Vermikompost	15
2.3. Parametry verмикompostování a skladba surovin	16
2.3.1. Sušina	16
2.3.2. pH.....	16
2.3.3. Měrná vodivost	17
2.3.4. C:N.....	18
2.3.5. Obsah prvků	18
2.3.6. Počet a biomasa žížal	19
2.3.7. Obsah mikroorganismů	19
2.3.8. Enzymatická aktivita.....	20
2.4. Srovnání kompostování a verмикompostování	23
3. Hypotézy a cíle práce	26
3.1. Hypotézy	26
3.2. Cíle práce	26
4. Metodika	27
4.1. Použité bioodpady	27
4.2. Vermikompostování	27
4.3. Analýzy	30
4.3.1. Fyzikálně-chemické analýzy	30
4.3.2. Biologické analýzy	30
4.3.3. Statistické analýzy	32
5. Publikované práce	34
5.1. Hanč, A., Částková (Hřebečková), T., et al. (2017). Dynamika verмикompostování v systému pásové hromady s vertikálním doplňováním	34
5.2. Hanč, A., Hřebečková, T., et al. (2019). Vermikompostování lihovarských výpalků v systému pásové hromady s vertikálním doplňováním	43

5.3. Částková (Hřebečková), T., Hanč, A. (2019). Změny parametrů vrstev vermikompostování matoliny ve velkém měřítku v systému průběžného krmení	55
5.4. Hřebečková et al. (2019). Změny enzymatické aktivity během vermikompostovacího procesu ve velkém měřítku v systému průběžného krmení	63
6. Sumární diskuse.....	72
7. Závěr.....	82
8. Seznam použité literatury	84

1. Úvod

Se stále více rostoucím počtem obyvatel na Zemi a jejich neustále rostoucími nároky, roste i množství vyprodukovaného odpadu, a to jak biologicky rozložitelného, tak i toho nerozložitelného. Největším problémem je to, jak vlastně odpad dále zpracovávat. Existuje několik více či méně ekologických možností. Tou nejméně ekologickou je samozřejmě skládkování (Björklund et al. 1999), které by se mělo velmi omezit, chceme-li jako členský stát splnit nařízení Evropské unie, dle kterého se nejpozději do roku 2035 musí procento skládkování snížit maximálně na 10 % (Směrnice Evropského parlamentu a rady EU 2018/850). Naopak více podporovaným způsobem je třídění biologicky rozložitelného odpadu do tzv. kompostejnerů, pro které byly v roce 2020 dokonce zlevněny poplatky za odvoz odpadu (pro Prahu) (Mana 2020). Další možností je spalování, kterému podléhá naprostá většina směsného odpadu z hlavního města Prahy. Za rok 2019 tak v Malešické spalovně skončilo na 277 tis. tun odpadu (Mana 2020). Nejvíce ekologickou variantou odstraňování bioodpadu je pak domácí či komunitní kompostování a v dnešní době již více rozšířené vermikompostování (Plíva et al. 2016).

Vermikompostování, stejně tak kompostování, je definováno, jako proces aerobní fermentace biologicky rozložitelného materiálu. Vermikompostování se od klasického kompostování liší především svou „bezúdržbovostí“, kdy není nutné manuální provzdušňování či překopávání vermikompostovací zakládky, neboť tuto činnost zastávají samotné žížaly (Sharma et al. 2005). Avšak je nutné více sledovat vlhkost během celého procesu vermikompostování. Ta by se právě kvůli žížalám měla pohybovat kolem 80 % (Edwards et al. 2011)

Vermikompostování je však ve velké většině případů využíváno ve formě domácího vermikompostování. Na téma vermikompostování v menším měřítku, především na téma laboratorního vermikompostování, byla publikována celá řada studií (Aria et al. 2011; Domínguez et al. 2013; García-Sánchez et al. 2017; Huang et al. 2014; Romero et al. 2010; Tripathi & Bhardwaj 2004). Vermikompostování ve velkém měřítku přímo v místě velké produkce odpadu, tj. v podnicích zpracovávajících například ovoce, zeleninu či jakýkoli jiný biologicky rozložitelný materiál, není v České republice ani ve světě rozšířené. A na toto téma nebyly v Čechách ani v zahraničí publikovány žádné odborné studie. Proto se předkládaná práce v první řadě zaměřuje na vermikompostování v konkrétních podnicích, kde odpad přímo vzniká. Jedná se o vermikompostování ve velkém měřítku v systému průběžného krmení žížal ve venkovních podmínkách.

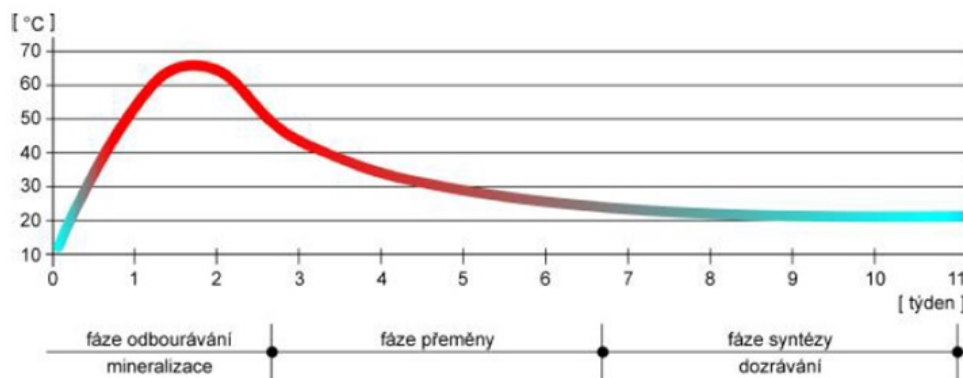
2. Literární přehled

2.1. Kompostování

Základem dobré kvality kompostu je zajištění podmínek pro příznivý průběh celého procesu. Důležitá je správná skladba surovin. Na základě složení výchozích surovin je dle potřeby vhodné doplnění dusíku, případně fosforu. Přídavek fosforu by se měl pohybovat tak, aby kompostovaná směs vykazovala obsah fosforu v sušině kolem 0,2 %. Dusík by měl být doplněn tak, aby byl dodržen poměr C:N 25 – 30:1 (Crecchio et al. 2004). Pro docílení ideálního poměru C:N je vhodné míchání různých druhů organických materiálů (např. piliny, které vykazují poměr C:N kolem 500:1, odřezané větve kolem 300:1 kůra 120:1, sláma mezi 60 a 100:1, čerstvá tráva kolem 20:1, hnůj 25:1). Při kompostování odpadu ze zahrady je tedy nutné vyrovnání poměru C:N, neboť by byl příliš široký (Vaněk et al. 2007). K dodání dusíku do kompostovací směsi jsou nejvhodnější statková hnojiva jako kejda skotu (s poměrem C:N 10:1), drůbeží trus (C:N 10:1) či močůvka (C:N 2:1) (Ginting et al. 2003; Vaněk et al. 2007). Možné je také použití minerálních hnojiv s amidovým nebo amonným dusíkem (močovina, síran amonný, DAM 390) (Vaněk et al. 2007). Kromě poměru C:N by během kompostování měly být dodržovány i další podmínky. Počáteční velikost částic by neměla být větší než 15 mm, vlhkost by měla být udržována mezi 55 a 60 % (vyšší hodnoty pouze při použití slámy nebo pilin), hladina kyslíku by měla být udržována na 10 – 18 %. Důležitým faktorem je výška kompostovací zakládky, ta by neměla být vyšší než 3 m, kvůli dobrému provzdušňování (Edwards et al. 2011). K rozkladu organické hmoty je třeba půdní mikroflóra. Výše zmíněné podmínky napomáhají rozvoji mikroorganismů. Může se tak docílit až desetkrát většího počtu mikroorganismů ve srovnání s klasickou půdou, což urychluje a intenzifikuje celý proces zrání kompostu (Váňa 1994). I tak je ale nutné do kompostovaného materiálu mikroorganismy dodávat. Nejideálnější možností jsou zeminy s dobrou sorpční kapacitou, které jsou nejen zdrojem právě půdní mikroflóry, ale také zdrojem jílových a minerálních částic. Zemina má také schopnost zadržovat vodu a pohlcovat vznikající zápach, působí na sorpci živin (především poutání vznikajícího NH_3) hlavně na začátku procesu kompostování, kdy nemá organická hmota téměř žádnou sorpční schopnost (Crecchio et al. 2004; Edwards et al. 2011). Statková hnojiva jsou též dobrým zdrojem mikroorganismů, a především snadněji rozložitelných organických látek (Ginting et al. 2003).

Kompostovací proces lze rozdělit do několika fází, v první řadě se jedná o navážení a soustřeďování surovin, jejich třídění, smísení a homogenizaci a následně samotné založení kompostu. Dále rozlišujeme tři fáze samotného kompostování (Obr. 1). Fázi rozkladu,

ve které probíhá velmi silný rozvoj mikroorganismů a teplota stoupá na 60 – 70 °C. Teplota fermentované směsi a doba, po kterou se takováto teplota udržuje je rozhodující pro průběh rozkladu organických látek a jejich transformaci na stabilnější formu. V této fázi dochází k uvolňování CO₂, NH₃ a minerálních látek. Fáze rozkladu trvá průměrně tři týdny (Vaněk et al. 2012) a je důležitá pro hygienizaci kompostovaného materiálu, při které dochází k zahubení patogenních mikroorganismů, zárodků a semen plevelů (Edwards et al. 2011). Na ni navazuje fáze přeměny, během které vznikají nové organické sloučeniny. Tato fáze trvá do osmého až desátého týdne kompostování a teplota pozvolně klesá. Během této fáze je značná část organických látek přeměňována na stabilnější humusové látky. Poslední fází, je fáze syntézy neboli zrání, ve které kompost dozrává. Průměrná doba trvání je od tří do šesti měsíců (Vaněk et al. 2012). V tomto období je teplota kompostu vyrovnána s teplotou okolního vzduchu. Během procesu kompostování dochází zprvu ke snížení pH bioodpadu a snížení obsahu organických látek přibližně o 40 % (Bernal et al. 2009). Současně dochází ke zvýšení počtu humifikovaných sloučenin (Edwards et al. 2011). Během domácího kompostování je vhodné alespoň jednou nebo nejlépe dvakrát, kompost překopat, ve velkých kompostárnách častěji. Finální úprava již zralého kompostu spočívá v prosévání, při kterém dochází k separaci nežádoucích nebo nerozložených částic. Prosetý kompost se následně expeduje (Vaněk et al. 2012).



Obr. 1: Průběh kompostování (Plíva et al. 2006).

Na trhu se objevují i komposty z bioreaktorů (biofermentorů), kde proces kompostování probíhá rovnoměrněji. V první fázi fermentace, která trvá dva až čtyři dny, dosahuje kompostovaný materiál v uzavřených reaktorech teplot v rozmezí 60 – 80 °C. V následujících přibližně deseti dnech 50 – 55 °C, je tedy zaručena velmi dobrá hygienizace odpadů a značně se urychluje proces přeměny organické hmoty. V následující fázi, která trvá asi jeden měsíc,

probíhá dozrávání kompostů klasickým krechtovým způsobem. Kompostování v bioreaktorech umožňuje sběr amoniaku, který je možné recyklovat jako hnojivo, a tak zabránit znečištění atmosféry. Statková hnojiva, především kejda a drůbeží podestýlka, zpracovávaná tímto způsobem představují velmi kvalitní kompost (Bernal et al. 2009).

Komposty hrají významnou roli v koloběhu látek a živin v přírodě. Mají nezastupitelnou úlohu ve využití a zapojení odpadů a vedlejších produktů rostlinné produkce do obnovy půdní úrodnosti. Kompost může při aplikaci do půdy mimo jiné poskytnout vysoký obsah živin ve formách přístupných pro rostliny, ale také zlepšení půdních fyzikálně-chemických vlastností, jako je ionto-výměnná kapacita, aerace půdy, propustnost, retenční schopnosti půdy, vsakování vody a zvýšení půdní úrodnosti. To vše významně přispívá ke snížení eroze půdy a ztráty živin z půdy povrchovým odtokem (He et al. 1992; Pinamonti et al. 1996). Pinamonti (1998) uvádí, že komposty zvyšují obsah organické hmoty v půdě, obsah fosforu a výměnného draslíku, stejně tak snižují teplotní výkyvy půdy a evaporaci vody. Celkový i přístupný obsah všech živin v kompostech závisí na výchozích surovinách. U průmyslových kompostů je stanoven pouze nejnižší obsah celkového dusíku (min. 0,6 %), poměr C:N (max. 30), obsah spalitelných látek (min. 25 %) a také obsah vody (40 – 65 %) (Vaněk et al. 2012). Aby zralý kompost splňoval uváděná kritéria pro průmyslové komposty, je nutné při zakládání sledovat obsah rizikových prvků v jednotlivých materiálech používaných ke kompostování (Vaca-Paulín et al. 2006). Přítomnost organických a anorganických kontaminantů v kompostovaném materiálu může představovat nebezpečí pro životní prostředí. V několika studiích byly po aplikaci kompostů, zejména z komunálního odpadu, pozorovány zvýšené obsahy hladiny rizikových prvků (především Zn, Cu a Pb), nejen v půdě, ale i v rostlinách (Bevacqua & Mellano 1993; Illera et al. 2000; Woodbury 1992). Nejméně vhodné půdy pro aplikaci kompostů z odpadu s vysokým obsahem rizikových prvků jsou písčité půdy s nízkou sorpční kapacitou a nízkým pH, které hůře adsorbují kovy (Mc Bride 2003). Dle Edwardse et al (2011) se sice v důsledku ztrát uhlíku během mineralizace celkové množství rizikových prvků zvyšuje, ale množství biologicky dostupných rizikových prvků má tendenci se snižovat vzhledem k tvorbě stabilních komplexů s huminovými látkami. Kvůli zamezení aplikace kompostů s vysokým obsahem rizikových prvků jsou vymezeny přístupné obsahy rizikových prvků, kterým musí vyhovovat kompost uváděný na trh dle přílohy č. I vyhlášky MZe č.271/2009 Sb., která upravuje limitní hodnoty rizikových prvků pro organická hnojiva se sušinou nad 13 %, kam patří i komposty (Tab. 1).

Tab. 1: Limitní hodnoty rizikových prvků pro organická hnojiva se sušinou nad 13 % (příloha č. I k vyhlášce MZe č. 271/2009 Sb.).

mg/kg sušiny								
kadmium	olovo	rtuť	arsen	chrom	měď	molybden	nikl	zinek
2	100	1,0	20	100	150	20	50	600

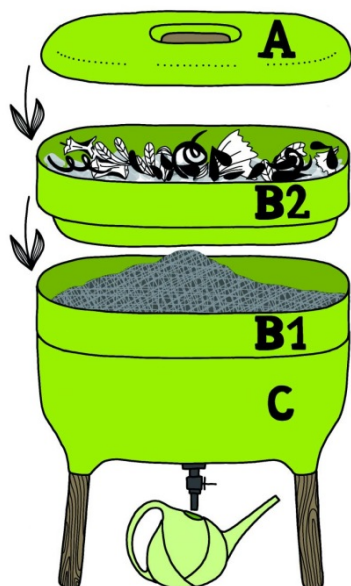
Použití kompostu na zemědělské půdě může přispět k rovnoměrnému rozložení živin a snížení využívání omezených zdrojů anorganických hnojiv. Ačkoli může být kompostování nákladnější než využívání surového hnoje či kejdy, je kompostování, v porovnání s ostatními technologiemi nakládání s odpady, méně nákladné (Edwards et al. 2011). Kompostování je považováno za alternativní zdroj organických látek k ostatním organickým hnojivům (Bernal et al. 2009). Pro zahradnické účely představuje kompost ekonomickou alternativu k rašelině (Edwards et al. 2011).

2.2. Vermikompostování

Vermikompostování je definováno jako metoda mezofilní aerobní fermentace organických materiálů za působení určitého druhu žížal (Hanč & Plíva 2013). Během procesu vermikompostování je velká část primární organické hmoty mineralizována na oxid uhličitý (CO₂), amoniak (NH₃) a vodu (H₂O), zbylá část je přeměněna na stabilní organickou hmotu podobnou humusovým látkám (Romero et al. 2007). Na procesu vermikompostování se podílejí jak žížaly, které jsou označovány za hnací motor celého procesu, tak i mikroorganismy, které interakcí s žížalami napomáhají s přeměnou organického odpadu na hnojivo (Champar- Ngam et al. 2010). Vermikompostování, stejně jako kompostování, probíhá v různých fázích. V případě vermikompostování je to fáze aktivní, kde dochází ke zpracování a přeměně organického materiálu, změně fyzikálních vlastností a mikrobiálního složení (Lores et al. 2006). A fáze dozrávací, které se účastní již jen mikroorganismy. Žížaly se přesouvají do nové, čerstvější vrstvy bioodpadu (Aira et al. 2007). Délka obou fází se odvíjí od složení bioodpadu a druhu žížal (Domínguez et al. 2010).

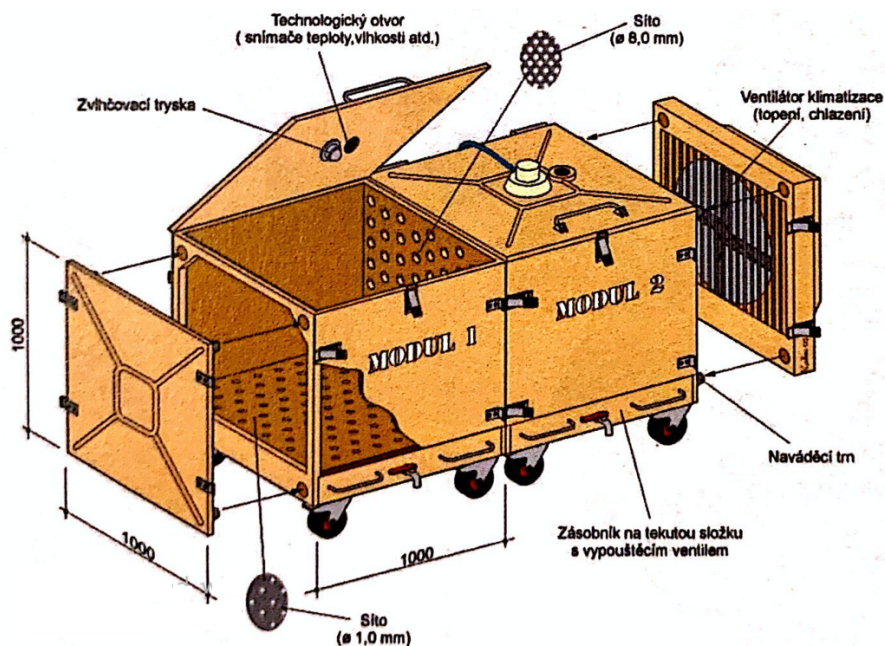
Vermikompostovat lze jak ve velkém, tak v malém měřítku. V malém měřítku je možné odpady vermikompostovat i přímo v domácnosti za využití vermikompostérů, které obsahují jednotlivé misky, jež je možné skládat na sebe (Obr. 2). Dnes jsou již dřevěné či plastové vermikompostéry velmi designové. Při domácím vermikompostování je nutné udržovat stálou teplotu kolem 20 °C a průběžně vermikompostovaný odpad zavlažovat. Případný výluh z vermikompostu odtéká, díky perforovanému dnu, a shromažďuje se v dolní části

vermikompostéru (Obr. 2 – dolní část C). Výluhy z vermikompostů lze také použít jako hnojivo. Uvádí se ideální poměr ředění 1:9 s vodou (Plíva et al. 2016).



Obr. 2: Domácí vermikompostér (<http://www.plastia.cz/produkt/urbalive/vermikomposter/>)

Vermikompostování v uzavřených prostorech s větší produkcí bioodpadu je možné řešit formou dvoumodulového vermireaktoru (Obr. 3). Ten je složen ze dvou nádob tzv. modulů, které jsou stejně velké a vespod mají kolečka, pro snadnou manipulaci. Moduly mohou fungovat jak odděleně, tak v pevném spojení. V případě oddělení modulů probíhá v prvním modulu takzvané předkompostování. Do modulu je přidáván nový – čerstvý bioodpad, který je následně předkompostován bez přítomnosti žížal. V druhém modulu probíhá následně proces vermikompostování již za přítomnosti žížal. Příklad pevného spojení obou modulů se využívá zejména k přesunu žížal z modulu 2, kde již proběhl proces vermikompostování, do modulu 1, kde je již předkompostovaný a žížalami nezpracovaný bioodpad. Žížaly se přesouvají samy, instinktivně za potravou. Ve druhém modulu, který žížaly právě opustily, pak zůstává zralý vermikompost. Proces je nutné monitorovat, a proto jsou oba dva moduly vermireaktoru vybaveny panelem pro sledování teploty a vlhkosti kompostovaného/vermikompostovaného materiálu (Hanč & Plíva 2013).

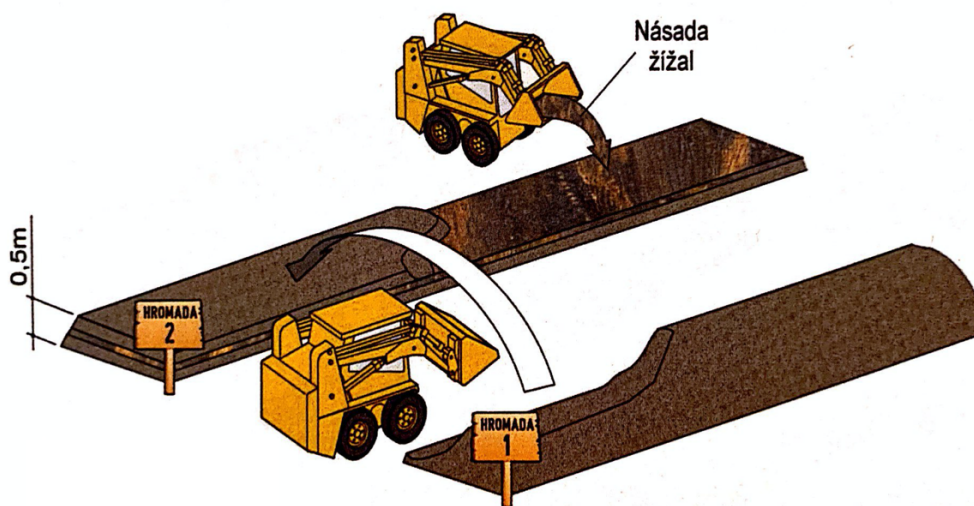


Obr. 3: Dvoumodulový vermireaktor (Hanč & Plíva 2013)

Další možností je vermikompostování na zahradách v nízkých záhonech (30 – 40 cm) s betonovým podkladem, kvůli zamezení vsaku výluhu z vermikompostu do půdy a přístupu krteků do vermikompostu. Alternativou k betonovému podkladu mohou být silné folie. Vhodným pro venkovní vermikompostování je odleželý hnůj domácích zvířat, listů či tráva v malých vrstvách (cca 15 cm) a odpad ze zahrady. Záhon je nutné dostatečně provlhčovat a zajistit odtok případného výluhu. Nové vrstvy bioodpadu se doporučuje přidávat každých 10 – 30 dnů. V zimě je nutné záhon dostatečně zateplit, například větší vrstvou trávy nebo slámy, tak aby bylo umožněno větrání (Hanč & Plíva 2013; Kalina 2004).

Vermikompostování je možné také ve velkém měřítku v podobě pásových nebo plošných hromad (Obr. 4). Hromady je ideální zakládat na zpevněných plochách. Zakládky je možné také zastřešit, proto je důležité sledovat a udržovat ideální vlhkost vermikompostovaného materiálu (cca 80 %). Překopávání nebo obracení není nutné, neboť tuto práci zastanou žížaly. Vermikompostování je tak investičně a provozně nenáročným procesem. Interval přikrmování se odvíjí od plánované výšky nové vrstvy bioodpadu: 1x týdně 10 – 15 cm, 1x za 14 dní 20 – 30 cm, 1x za tři týdny 30 – 50 cm. Žížaly se zdržují v horních vrstvách zakládek, a tak je možné, u již vysokých zakládek, využít vrchní vrstvy bioodpadu s žížalami pro založení nové vermikompostovací zakládky (Hanč & Plíva 2013). Je nutné nepřidávat do kompostů jakékoli odpady bez znalosti jejich původu a složení, z hlediska možné kontaminace nežádoucími organickými polutanty a rizikovými prvky. Velká část odpadů,

zvláště z různých skládek, může být značně znečištěna a může tak způsobit průnik nežádoucích látek do půdního prostředí a následně i do potravního řetězce (Vaněk et al. 2012).



Obr. 4: Vermikompostování v podobě pásových hromad (Hanč & Plíva 2013)

2.2.1. Žížaly

Žížaly se řadí do kmene Annelida (kroužkovci), podkmene Cittelata (opaskovci), třídy Oligochaeta (máloštětinatci) řádu Haplotaxida a podřádu Lumbricina (žížaly). Rozlišujeme tři druhy žížal, anektické, epigeické a endogeické (Ismail 1995). V České republice se vyskytuje ve volné přírodě kolem 50 druhů žížal, mezi nimi např.: žížala hnojní (*Eisenia fetida*), žížala dlouhá (*Aporrectodea longa*), žížala polní (*Aporrectodea caliginosa*) a další. Pro proces vermikompostování jsou nejvhodnější druhy, žijící ve svrchní vrstvě půdy, které nevytváří trvalé nory a živí se primární organickou hmotou a humusem z povrchu půdy, tedy žížaly epigeické (Mc Lean & Parkinson 1998). Mezi nejvyužívanější druhy pro vermikompostování patří například žížala hnojní (*Eisenia fetida*) a vyšlechtěná žížala kalifornská (*Eisenia andrei*), dále pak evropská dešťovka (*Dendrobaena veneta*), žížala načervenalá (*Lumbricus rubellus*), africká dešťovka (*Eudrilus eugeniae*) nebo „modrý červ“ (*Perionyx excavatus*) (Zajonc 1992).

Žížala hnojní (*Eisenia fetida*) má rudohnědou barvu a dorůstá délky 3 – 12 cm a průměru kolem 2 – 4 mm. Živí se převážně rozkládajícím se rostlinným materiálem (Zajonc 1992). Dle Huang et al. (2014) je *E. fetida* nejvhodnějším druhem pro rozklad zbytků ovoce a zeleniny, odpadu z údržby zahrad a parků (listí, tráva, zbytky rostlin), odpadu z papírenského průmyslu či čistírenského kalu. Ideální teplotou pro život a rozmnožování je 25 °C. S teplotou

přímo souvisí i výše spotřeby potravy, která je při ideální teplotě vyšší. Tím se zvyšuje i rychlost rozkladu biologicky rozložitelného materiálu. *E. fetida* se vyznačuje i vyšším tempem rozmnožování. To je zajištěno tak, že do jednoho kokonu kladou několik vajíček najednou a jejich mláďata rychle dospívají (Zajonc 1992).

Žížala kalifornská (*Eisenia andrei*) byla speciálně vyšlechtěna právě z volně žijící žížaly hnojní (*E. fetida*) za účelem zpracování organického materiálu. *E. andrei* zpracovává biologicky rozložitelný materiál značně rychleji než její předchůdkyně. Má jednolitou barvu, tmavě nebo světle rudou. Ideální teplotou k životu a rozmnožování je rozmezí od 15 do 25 °C. Její rozměry jsou téměř totožné jako u *E. fetida* (Zajonc 1992).

Některé druhy žížal (*Eudrilus eugeniae*, *Eisenia fetida* a *Perionyx excavatus*) mají také schopnost kumulovat ve svém těle rizikové prvky, jsou schopny odfiltrovat z organické hmoty až 75 % všech rizikových prvků. Rizikové prvky jsou akumulovány do žížal a ztrácí tak mobilitu ve vermikompostovaném materiálu (Pan & Wang 2009). Jako potrava slouží žížalám biologicky rozložitelný materiál (nejlépe předfermentovaný) s poměrem C:N v ideálním rozmezí 25:1 – 30:1 (Edwards et al. 2011). Při ideálních podmínkách jsou žížaly schopny zkonzumovat 0,5 – 1 násobek jejich tělesné hmotnosti. Většinou zpracují jakýkoli biologicky rozložitelný materiál (Gaddie & Douglas 1975). Nedělají jim problém zbytky zemědělských plodin a zbytky z domácností, ze zahrad, živočišné odpady, některé průmyslové odpady, zejména odpady z pivovaru, lihovarnictví, ze zpracování cukrové třtiny nebo čistírenské kaly (Atiyeh et al. 2000b; Sinha et al. 2010). Žížaly využijí něco kolem 40 % organických látek. Zbytek, tvořený především již natrávenou organickou hmotou, vylučují do prostředí. Takto vzniklý vermikompost obsahuje vysoký podíl huminových kyselin, díky nimž je možné docílit až desetkrát většího počtu mikroorganismů oproti klasickému kompostu (Carrasquero-Durán et al. 2009). Žížaly kromě dostatku organického materiálu vyžadují také vlhkost v rozmezí 80 – 85 % (mezní hodnoty 60 – 90 %) (Edwards et al. 2011). Ačkoli Georg (2004) uvádí, že ideální vlhkost je 75 – 80 %. Během tuhé zimy se může stát, že ve vermikompostovací zakládce nebude dostatek kyslíku, žížaly však dokážou využít kyslík zabudovaný v molekulách vody (Munroe, 2007).

Dle Syerse a Springetta (1984) je možné tvrdit, že žížaly mají pozitivní vliv na růst rostlin. Za prvé tím, že napomáhají při rozkladných procesech a tím urychlují proces mineralizace. Za druhé tím, že zlepšují celkové fyzikální, chemické a biologické vlastnosti půdy, mají pozitivní vliv na udržení drobtovitých agregátů, což zlepšuje vzdušný a vodní režim půdy. Díky tomu může klesnout spotřeba vody až o 40 % (Sinha et al. 2010). Žížaly mohou mít vliv také na transport iontů v půdě (Elad 1994). Ovlivňují množství živin v půdě, zejména N,

P, K a Ca, které jsou snadno využitelné rostlinami, neboť je velká část těchto živin obsažena ve slizu a výkalech žížal (Arthur et al. 2012). Činnost žížal nejen zrychluje rozklad primární organické hmoty (Lv et al. 2013), ale má také vliv na výskyt půdních mikroorganismů (Syers & Springett 1984), díky kterým mají vermikomposty jemnou strukturu a obsahují živiny ve formách snadno přístupných pro rostliny (Garg et al. 2006; Tripathi & Bhardwaj 2004).

2.2.2. Vermikompost

Finálním produktem celého procesu je kvalitní hnojivo, vermikompost. Hotový vermikompost by měl, dle normy pro vermikompostování, být hnědé, šedohnědé až černé barvy. Měl by být homogenní, drobovitě a hrudkovité struktury, bez nezapojitelných částic. Neměl by vykazovat pachy svědčící o přítomnosti jakýchkoli nežádoucích látek (ČSN 46 5736). Stejně tak, by měl splňovat technické požadavky udávané ČSN 46 5736 (Tab. 2). Měl by splňovat i hodnoty shodné pro komposty dle přílohy č. I vyhlášky MZe č.271/2009 Sb., která upravuje limitní hodnoty rizikových prvků pro organická hnojiva se sušinou nad 13 % (Tab. 1).

Tab. 2: Kvalitativní znaky a obsah živin ve vermikompostu (ČSN 46 5736).

Znak jakosti	Hodnota
Vlhkost [%]	50 – 70
Spalitelné látky ve vysušeném vzorku [%]	min. 35
Celkový dusík jako N přepočtený na vysušený vzorek [%]	min. 1
Poměr C:N	max. 30
Hodnota pH	6 – 9
Nerozložitelné příměsi [%]	max. 2
Celkový P ₂ O ₅ v sušině [%]	min. 0,6
Celkový K ₂ O v sušině [%]	min. 1

Vermikompost je možné rozdělit do tří skupin dle jeho struktury: Polohrubý – má hrubší strukturu a je možné ho použít jako náhradu za statkový hnůj; Jemný zahradní – má jemnější strukturu a používá se jako náhrada za statkový hnůj, ale lze jej použít i pro pokojové rostliny či parkové trávníky; Speciální jemný golfový – má velmi jemnou strukturu a aplikuje se přímo na nově založený či již vzrostlý trávník (Pecl 2007).

Obsah živin ve vermikompostech je často mnohem vyšší než v tradičních kompostech (Dickerson 2001). Obsahuje také kvalitní humus, růstové hormony a stále aktivní enzymy (Sinha et al. 2010). Hlavním využitím vermikompostů je hnojení, například trávníků a jiných zahradních nebo pokojových rostlin nebo jej lze použít jako mulč (Dickerson 2001). Vermikomposty lze dle Mikeše (2008) mimo jiné také využít k odstranění kovových iontů z odpadních vod či jako prostředek k biofiltraci vzduchu, eliminující zápach při anaerobní digesci. Vermikomposty lze také využít v kombinaci s fytoremediací při odstraňování kontaminace půdy polyaromatickými uhlovodíky (Wang et al. 2012). Vermikompost může sloužit jako prevence výskytu rostlinných patogenů a parazitů rostlin, například dle Edwardse et al. (2004) snižuje míru poškození od mšic, či housenek. Celkový obsah dusíku při hnojení vermikompostem by měl být dle pokusu Bhadauria a Ramakrishnana (1996) statisticky významně vyšší než při použití zeleného hnojení či hnoje. Hnojení vermikompostem dle Wanga et al. (2012) pozitivně ovlivňuje mikrobiální aktivitu v půdě a zvyšuje tvorbu kořenového systému rostlin. Dle Sinhy et al. (2010) tak hnojení vermikompostem šetří pěstitelům peníze za průmyslová hnojiva a pesticidy.

2.3. Parametry vermikompostování a skladba surovin

2.3.1. Sušina

Obsah vlhkosti ve vermikompostech by měl být udržován v rozmezí 60 – 90 %. Vyšší vlhkost může způsobit nedostatek kyslíku, který je potřebný pro život žížal (Munroe 2007). Naopak nižší hodnoty vlhkosti mohou zapříčinit vysušení těl žížal, neboť dýchání žížal probíhá celým povrchem těla, je tedy nutné pravidelné vlhčení vermikompostovaného bioodpadu (Garg & Gupta 2009; Plíva et al. 2016). Pravidelným vlhčením udržovali ideální vlhkost také Atiyeh et al. (2000a) při vermikompostování kravského hnoje, kde byla počáteční vlhkost 78 %, během prvního týdne klesla na 76 % a následně stoupala až na 81 % ve 14. týdnu vermikompostování. S ideální vlhkostí je během celého procesu vermikompostování mimo jiné úzce spojen i transport živin, díky ideální vlhkosti je zajištěn správný průběh chemických procesů (Yadav & Garg 2011a).

2.3.2. pH

Ideální hodnota pH vermikompostovaného materiálu by se měla pohybovat v rozmezí 5 – 9 (Munroe 2007). Malat'ák (2008) a Rostami (2011) uvádějí, že optimální pro život žížal je pH neutrální. Žížaly jsou však schopny pH jejich potravy upravovat, díky vápenatým žlázám,

jež ústí do jícnu žížal (Plíva et al. 2016). Během celého procesu vermikompostování dochází ke změnám pH jak vlivem mikroorganismů a samotných žížal, tak rozkladem složitých organických látek na látky jednodušší (Singh et al. 2005). Při biodegradaci organického odpadu dochází ke vzniku meziproduktů (fulvonové kyseliny, huminové kyseliny, amoniak), jejichž kladně či záporně nabitě částice ovlivňují hodnotu pH (Pramanik et al. 2007). Tato tvrzení potvrzuje pokus Fernandéze-Gómeze et al. (2010) s vermikompostováním zbytků po pěstování rajčat, kde došlo ke zvýšení pH z hodnoty 8,3. Během prvních 30 dnů se hodnota pH zvýšila na 9,1, pak hodnota pH kolísala mezi 8,6 – 9,5 až se v době zrání (po 210 dnech) ustálila na hodnotě 10,4. Úpravu pH z velmi kyselých hodnot ukazuje pokus Domíngueze et al. (2014), s vermikompostováním matoliny, kde byla počáteční hodnota 4,36, po 56 dnech vermikompostování hodnota stoupla na 8,17, již zralý vermikompost vykazoval hodnotu 7,1 (po 112 dnech vermikompostování).

Kvůli nízké hodnotě pH se nedoporučuje vermikompostovat citrusy nebo jejich zbytky. Citrusy často bývají chemicky ošetřeny (Priatelía Zeme 2003). Nevhodné jsou také cibule, neboť snižují pH substrátu a tím omezují aktivitu žížal.

2.3.3. Měrná vodivost

Žížaly jsou velmi citlivé na obsah solí. Vysoké zasolení značí i vysoké hodnoty měrné vodivosti. Ideální obsah solí vermikompostovaného materiálu je přibližně 0,5 % (Gunadi et al. 2002). Z četných studií je ale známo, že žížaly akceptují i vyšší hodnoty a dokáží během procesu vermikompostování snižovat měrnou vodivost počátečních surovin. Například v pokusu Domíngueze et al. (2016), s vermikompostováním matoliny, byla měrná vodivost samotné matoliny 1,4 mS/cm, zatímco měrná vodivost finálního vermikompostu byla 0,27 mS/cm.

Vermikompostovat lze i mořské řasy, ty by však měly být nejprve propláchnuty, aby z nich byla smyta veškerá sůl, která zůstává na povrchu. Vysoký obsah rozpustných solí má i řada typů hnoje. Pokud je hnůj použit ve směsi jako potrava pro žížaly, tak to většinou nebývá problém, neboť se mu žížaly mohou dočasně vyhnout, dokud nedojde k odplavení solí. Z hnojů je jako nejideálnější potrava pro žížaly považován hnůj skotu (Gaddie & Douglas 1975).

2.3.4. C:N

Poměr C:N je jeden z parametrů využívaných při hodnocení stability a kvality vermikompostů. Přímo ovlivňuje aktivitu a metabolismus žížal (Ndegwa et al. 2000). Ideálně by měl být během procesu vermikompostování dodržován poměr kolem 25:1 s maximálními hraničními hodnotami 20 – 40:1, při vyšších hodnotách dochází ke zpomalení rozkladných procesů (Garg & Gupta 2009). Poměr je možné upravit smícháním více druhů bioodpadů, v praxi se totiž častěji, než jedna surovina používají kombinace více surovin smíchané v různém poměru (Yadav & Garg 2011b). Využívá se kombinace vlhkého (čerstvějšího) a suchého (dřevnatějšího) materiálu tak, aby měly suroviny v ideálním poměru organickou a anorganickou složku (Borkovcová & Žáková 2015). Obecně platí, že čím je materiál různorodější, tím lépe se kompostuje (Hanč 2017). Vyšším obsahem uhlíku se vyznačují například piliny či sláma, naopak vyšší obsah dusíku mají například kaly (Garg & Gupta 2009; Sinha et al. 2009). V průběhu vermikompostování dochází k přirozeným změnám v poměru C:N. Uhlík je spotřebováván a uvolňován do ovzduší v podobě CO₂, zatímco dusík je dodáván v podobě žížalích exkrementů, tak dochází ke snižování poměru (Nagavallemma et al. 2004). Pokud je ve směsi materiálu užší poměr uhlíku a dusíku a proces vermikompostování není ještě ukončen, je ideální přidat rostlinný materiál, a naopak při vyšším množství uhlíku, přidáváme například zvířecí exkrementy, substrát tak zraje rychleji (Zajonc, 1992). Při dosažení nižšího poměru než 20:1 ve finální fázi vermikompostování se dle Garga a Gupty (2009) jedná již o stabilizovaný organický odpad – tedy stabilní vermikompost. To potvrzují hodnoty C:N z pokusu s vermikompostováním kravského hnoje Atiyeha et al. (2000a), kde počáteční hodnota C:N byla kolem 35:1. Během prvního týdne mírně stoupla (40:1) a následně klesala úměrně s délkou vermikompostování až na cca 20:1 v 17. týdnu vermikompostování. V pokusu s vermikompostováním matoliny Domíngueze et al. (2014) byl dokonce počáteční poměr C:N pouze 24:1, hodnota zralého vermikompostu tak byla ještě nižší 12,7:1.

2.3.5. Obsah prvků

Důležitou roli hraje skladba surovin, která určuje poměr živin (Domínguez & Edwards 2011). Arthur et al. (2012) uvádějí, že i samotné žížaly značně ovlivňují množství živin přístupných pro rostliny. Žížaly mohou akumulovat živiny v jistých formách a tím snižovat mobilitu živin v substrátu (Pan & Wang 2009). Současně však žížaly značné množství živin vylučují spolu s výkaly (Shipitalo & Protz 1989). S postupným úbytkem primární organické

hmoty se během procesu vermikompostování obsah makroživin zvyšuje (Domínguez & Gómez-Brandón 2013). V pokusu Domíngueze et al. (2014), s vermikompostováním matoliny, došlo, u celkového obsahu fosforu, nejprve po 56 dnech vermikompostování ke statisticky významnému poklesu ze 4030 mg/kg na 2800 mg/kg a po dalších 56 dnech ke statisticky významnému nárůstu i oproti původní surovině (8360 mg/kg). Celkový obsah fosforu v pokusu Hanče a Vašáka (2015), s vermikompostováním digestátu v kombinaci se slámou v různých poměrech, se po pěti měsících vermikompostování zvýšil až o 50 % oproti počátečnímu stavu, stejně tak došlo k navýšení celkového obsahu draslíku (o 30 – 100 %) a hořčíku (o 70 – 120 %).

2.3.6. Počet a biomasa žížal

Počet i biomasa žížal bývá obecně nejvyšší v nejmladších vrstvách vermikompostovacích zakládek, neboť se žížal přesouvají za potravou. Spodní vrstvy obsahují již žížalami zpracovaný materiál a vykazují značně anaerobní podmínky (Hanč et al. 2017). To potvrzuje i pokus Garcíi-Sánchez et al. (2017), s vermikompostováním koňského hnoje, jablečných výlisků, matoliny a digestátu v systému průběžného krmení, kde byl nalezen nejvyšší počet i biomasa žížal ve 120 dnů staré vrstvě (druhé nejmladší) u všech variant vermikompostovaných bioodpadů. Naopak nejnižší biomasa i počet žížal (nulový) byl nalezen ve vrstvě nejstarší (240 dnů).

Volba správného složení bioodpadu je základním předpokladem k vytvoření kvalitního vermikompostu. Nejideálnější volbou pro vermikompostování je odpad rostlinného původu, tedy odpad ze zahrady či domovní odpad, jako je listí, části dřevin (štěpka, piliny), ale také zbytky z kuchyně či papírové kapesníky. Skladba surovin má přímo vliv na počet a biomasu žížal (Sulzberger & Minátová 1996). Masné výrobky a ryby, jsou pro vermikompostování nevhodné, neboť žížaly nemají schopnost je zpracovávat. Stejně tak se nehodí ani oleje, ty neumožňují dostatečný průchod kyslíku a vytvářejí tak anaerobní prostředí (Singh 2014). Nedoporučuje se ani větší množství čerstvého listí či trávy, ty při rozkladu uvolňují velké množství tepla, které je pro žížaly neakceptovatelné (Gaddie & Douglas 1975).

2.3.7. Obsah mikroorganismů

Mikroorganismy se za podpory enzymů a žížal podílejí na rozkladných procesech. Při dekompozici organické hmoty jsou aktivní zejména bakterie *Aminobacter aminovorans* nebo *Bacteroides reticulotermitis* a houby *Citeromyces matritensis* či *Arthrobotrys oligospora*

(Huang et al. 2014). Monroy et al. (2008), ve svém pokusu s odstraňováním koliformních bakterií z čerstvé prasečí kejdy pomocí žížal uvádějí, že jsou žížaly schopny redukovat až 85 % koliformních bakterií. I tak ale bylo v řadě studií zabývajících se vermikompostováním nalezeno vyšší množství bakterií než hub. Například v pokusu Goméze-Brandóna et al. (2011), s vermikompostováním matoliny, byl naměřen poměr bakterií a hub 14:1; v pokusu Arii et al. (2011), s vermikompostováním kravského hnoje, se poměr bakterií a hub pohyboval okolo 30:1; v pokusu Romera et al. (2010), taktéž s vermikompostováním matoliny, byl poměr bakterií a hub dokonce 164:1. Flack et al. (2008) uvádějí, že žížaly napomáhají rozšiřování mikrobiálních společenstev, zpřístupňují svou aktivitou jak bakteriím, tak houbám předzpracovaný výživově bohatý materiál. Nejvyšší obsah mikroorganismů tak bývá ve vrstvách s vysokou aktivitou žížal, tedy ve vrstvách mladších. V pokusu Arii et al. (2011), s vermikompostováním kravského hnoje, byla zaznamenána nejvyšší hodnota celkového obsahu mikroorganismů právě v nejmladší vrstvě 900 $\mu\text{g PLFA.g}^{-1}$ sušiny, což bylo o 300 $\mu\text{g PLFA.g}^{-1}$ sušiny více než v ostatních vrstvách, stejně tak byl v nejmladší vrstvě naměřen jak nejvyšší obsah bakterií (650 $\mu\text{g PLFA.g}^{-1}$ sušiny), tak i hub (20 $\mu\text{g PLFA.g}^{-1}$ sušiny). Aktinobakterie bývají zastoupeny v nižším počtu, neboť je k jejich životu třeba kyslejší pH (Rousk et al 2010). Vyšší obsah bakterií je podmíněn zvýšeným procentem vody a snadno rozložitelných látek. Houbové kolonie se během celého procesu vermikompostování pohybují v nižších koncentracích, neboť houbové buňky slouží také jako potrava pro žížaly (Schönholzer et al 1999). Stejně tak je výskyt hub podmíněn hodnotou pH. Houby se lépe rozmnožují při nižších hodnotách pH, při vyšších hodnotách jejich produkce klesá (Gock et al 2003).

2.3.8. Enzymatická aktivita

Limitní hodnoty aktivity jednotlivých enzymů u zralých vermikompostů uvádí certifikovaná metodika Hanče et al. (2018) (Tab. 3). Hladina jednotlivých enzymů značně kolísá během celého procesu vermikompostování.

Tab. 3: Limitní hodnoty enzymatické aktivity jednotlivých zralých vermikompostů (Hanč et al. 2018).

Enzym	1.	2.	3.	4.
β-D-glukosidáza [μmol MUFG.g ⁻¹ .h ⁻¹]	< 900	< 2 000	< 2 000	< 2 100
Fosfatáza [μmol MUFP.g ⁻¹ .h ⁻¹]	< 1 100	< 1 500	< 1 800	< 1 100
Arylsulfatáza [μmol MUFS.g ⁻¹ .h ⁻¹]	< 70	< 60	< 60	< 30
Lipáza [μmol MUFY.g ⁻¹ .h ⁻¹]	< 10 700	< 8 600	< 11 900	< 10 100
Chitináza [μmol MUFN.g ⁻¹ .h ⁻¹]	< 1 800	< 3 500	< 90	< 200
Celobiohydroláza [μmol MUFC.g ⁻¹ .h ⁻¹]	< 900	< 1 500	< 200	< 200
Alanin aminopeptidáza [μmol AMCA.g ⁻¹ .h ⁻¹]	< 200	< 300	< 30	< 10
Leucin aminopeptidáza [μmol AMCL.g ⁻¹ .h ⁻¹]	< 200	< 200	< 70	< 40
Úreáza [μg NH ₄ -N.g ⁻¹ .2 h ⁻¹]	< 200	< 300	< 100	< 400
Nitrát reduktáza [μg NO ₂ -N.g ⁻¹ .24 h ⁻¹]	< 20	< 20	< 10	< 20

Legenda: 1. vermikomposty s biologicky rozložitelným komunálním odpadem; 2. vermikomposty s lihovarskými výpalky; 3. vermikomposty se zemědělským bioodpadem a s kalem ze sladovny; 4. vermikomposty s matolinou.

β-D-glukosidáza

Enzym celulóza katalyzuje hydrolýzu celulózy na D-glukózu, ta je tvořena nejméně třemi enzymy: endo-1,4-glukanázou, exo-β-1,4-glukanázou a β-glukosidázou (Horáková & Němec 2003). β-glukosidázy tvoří velmi heterogenní skupinu enzymů hydrolyzujících glukózové oligosacharidy (Bočková & Kleňha 1972). Nejčastěji jsou produkovány houbami, např. rodu *Actinomyces* či *Clostridium* (Horáková & Němec 2003).

Kyselá fosfatáza

Kyselá fosfatáza patří mezi hydrolázy, konkrétně mezi fosfomonoesterázy, které katalyzují hydrolýzu anhydridů a monoesterů kyseliny fosforečné (Horáková & Němec 2003). Dochází tak k mineralizaci organického fosforu (Enowashu et al. 2009). Obecně jsou fosfatázy děleny na kyselá fosfatázy, které jsou přítomny převážně v kořenových exudátech,

a alkalické, které jsou naopak vylučovány především půdními mikroorganismy (Šarapatka & Čáp 2013).

Arylsulfatáza

Arylsulfatázy spadají do třídy hydroláz. Obecně sulfatázy jsou zapojeny do biochemické mineralizace organické síry (Tabatabai & Bremner 1971). V přírodě se vyskytují různé typy sulfatáz: alkylsulfatázy, arylsulfatázy, aj. Nejvíce prozkoumanou je arylsulfatáza, která vzniká převážně činností bakterií a hub, i když je arylsulfatáza produkována také rostlinami a živočichy. Arylsulfatáza katalyzuje hydrolýzu arylsulfátového aniontu přerušením vazby O – S. Tabatabai a Bremner (1970) předpokládají, že arylsulfatáza přispívá k mineralizaci organické síry na $S-SO_4^{2-}$.

Lipáza

Lipázy jsou důležité pro hydrolýzu acylglycerolů, obsahujících řetězce mastných kyselin s počtem uhlíků vyšším než 9, na mastné kyseliny a glycerol (Horáková & Němec 2003). Souběžně tak dochází k uvolňování esterových vazeb mezi mastnými kyselinami a glycerolem (Šarapatka & Čáp 2013). Lipázy mohou být aktivní i v prostředí s nízkým obsahem vody, v jejich přítomnosti nejsou problémy s rozpouštěním hydrofobních substrátů (Linek 2002).

Chitináza

Chitinázy odpovídají za rozklad chitinu. Hydrolyzují glukosidické vazby chitinu, za současného uvolnění menší organické sloučeniny, obsahující dusík. Chitin je jednou z dominantních forem dusíku, ve které se dostává do půdy. Hlavními producenty chitinázy jsou především houby, ale také bakterie, kvasinky, korýši a měkkýši. Chitin je hlavní složkou buněčné stěny hub. Aktivita chitinázy může být potlačována, stejně jako u fosfatázy, jejími produkty, a to zejména glukózou a N – acetylglukosaminem (Gooday 1994).

Celobiohydroláza

Celobiohydrolázy hydrolyzují β -D-glukosidické vazby v celotetraóze a celulóze. Uvolňují celobiózu nebo glukózu z celulózového řetězce. Podílejí se spolu s β – glukosidázou a endoklukanázou na rozkladu strukturních polymerů. Jsou produkovány vřeckovýtrusnými houbami (Ascomycota) především druhem *Trichoderma reesei* (Mertz et al. 2007).

Leucin a alanin aminopeptidáza

Aminopeptidázy štěpí proteiny během trávení. Leucin aminopeptidáza uvolňuje koncový N z aminokyselin, peptidů, amidů nebo arylamidů především z leucinu či prolinu, na druhou stranu alanin aminopeptidáza uvolňuje koncový N z aminokyselin, peptidů, amidů nebo arylamidů, především z alaninu či prolinu (Wickström et al. 2011).

Ureáza

Ureáza je produkována bakteriemi, především druhem *Helicobacter pylori*. Ureáza katalyzuje hydrolýzu močoviny na CO₂ a NH₃. Aktivita ureázy je přímo závislá na obsahu organického uhlíku. Jejím působením dochází ke zvyšování pH okolního prostředí (Dick 1984).

Nitrát reduktáza

Nitrát reduktáza redukuje dusičnanový iont na iont dusitanový. Je tvořena a produkována především rostlinami. Skládá se z flavinoproteinu, molybdenového komplexu a hemu. Aktivita nitrát reduktázy je závislá na intenzitě slunečního světla, obsahu kyslíku a teplotě okolí. Při vyšší intenzitě světla, vyšším obsahu kyslíku a nižší teplotě je aktivita nitrát reduktázy vyšší (Hageman & Hucklesby 1971).

2.4. Srovnání kompostování a vermikompostování

Hlavním rozdílem mezi kompostováním a vermikompostováním je, že při vermikompostování nedochází k termofilní fázi, která je pro klasické kompostování typická (Plíva et al. 2016). Zatímco u kompostování dochází k hygienizaci právě v termofilní fázi rozkladu (teploty kolem 60 – 70 °C), u vermikompostování je to zhruba po 70 dnech vermikompostování (Tab. 4). Celkově se tedy teplota při vermikompostování pohybuje v rozmezí 15 – 25 °C. Poměr C:N se u obou metod téměř neliší, stejně tak počáteční velikost částic. Čím větší kusy bioodpadu chceme kompostovat či vermikompostovat, tím bude proces pomalejší. Dalším zásadním rozdílem je vlhkost, kterou je nutné udržovat během obou procesů. U kompostování stačí dodržovat vlhkost kolem 50 – 60 %, u vermikompostování se jedná ale o vlhkost v rozmezí 80 – 85 %. Vyšší vlhkost u vermikompostování je nutná právě kvůli ideálním podmínkám pro život žížal. Co se týče okysličování, tak u obou procesů je nutné provzdušňování. U kompostování kvůli správnému průběhu procesu a u vermikompostování právě kvůli samotným žížalám. Ale zatímco u kompostování musíme aerobní podmínky

zajišťovat ať manuálně nebo pomocí strojů, tak u vermikompostování tento proces zastanou samy žížaly (Edwards et al. 2011).

Tab. 4: Charakteristika kompostování a vermikompostování (upraveno dle Edwardse et al. 2011)

Faktor	Kompostování	Vermikompostování
Poměr C:N	25 : 1 - 30 : 1	20 : 1 - 30 : 1
Počáteční velikost částic	10 – 15 mm	10 – 20 mm (větší částice zpomalují proces)
Vlhkost	55 – 60 % (více pouze při použití slámy nebo pilin)	80 – 85 % (mezní hodnoty 60 – 90 %)
Okysličení	Nutné udržování hladiny kyslíku ve výši 10 – 18 % překopáváním	Žížaly vyžadují aerobní podmínky a zajišťují provzdušnění
Zpětná kontrola	Pomocí teploty nebo kontrola kyslíku pomocí dmyhadla v aerátorech	
Teplota	≤ 70 °C	15 °C – 25 °C (mezní hodnoty 4 °C – 30°C)
pH	≥ 5 a 9 ≤	≥ 5 a 9 ≤
Obsah NH ₃		≤ 0,5 mg/g
Velikost vermi/kompostové zakládky	Libovolná délka; výška 1,5 m; šířka 2,5 m pro komposty s přirozenou aerací. Pro komposty s řízenou aerací může být výška větší.	Libovolná délka a šířka, výška 50 cm (vyšší hodnoty zpomalují nebo dokonce zastavují proces)
Velikost reaktoru	Důležitým faktorem je výška, u mas vyšších než 3 m může být vážný problém s větráním	Délka 40 m; šířka 2,4 m; hloubka 1 m. Odpady by se měly dávkovat v tenkých vrstvách silných 5 – 10 cm.
Lidské patogeny	Jsou zabity při termofilní fázi	Jsou zabity do 70 dnů vermikompostování
Čas rozkladu	Po samo-vyhřívání a termofilní fázi (cca týden), následuje několik měsíců „zrání“ při mesofilních teplotách (30 – 40°C)	od 4 do 12 měsíců, ve spojitých systémech reaktorů do 30 – 60 dnů

Marcinčák (2015) uvádí, že vermikomposty v řadě ukazatelů převyšují svou kvalitou klasické komposty. Vermikomposty obsahují růstové hormony, dále enzymy, které jsou schopny chránit rostliny před chorobami a škůdci, obsahují kvalitní humus a při aplikaci do půdy umožňují lepší využití minerálních látek v nich obsažených (Krása 2014). Látky prospěšné pro rostliny jsou u vermikompostů aplikovaných do půdy vstřebatelné z 80 – 90 %, zatímco u kompostů je to pouze z 60 – 70 % (Borkovcová & Žáková 2015).

Hanč et al. (2013) uvádějí, že jsou vermikomposty považovány za nejúčinnější organické hnojivo, zejména kvůli přítomnosti žížalích výkalů, které obsahují huminové kyseliny, jejichž agronomická účinnost je až o 60 – 70 % vyšší než u klasických kompostů.

Ačkoli se v obou případech jedná o metody, využívání bioodpadu, šetrné k životnímu prostředí, tak velký rozdíl v klasickém procesu kompostování a vermikompostování z pohledu dlouhodobého a velkoplošného měřítka nalezneme v ceně obou procesů. Vermikompostování se řadí k nízkonákladovým technologiím zpracování bioodpadu. V případě vermikompostování je v podstatě jedinou investicí nákup násady žížal a zavlažování, v případě klasického kompostování je ale nutné jak případné zavlažování, tak pravidelné mechanické provzdušňování, které je velmi nákladné (Kalina 2014; Plíva et al. 2016).

3. Hypotézy a cíle práce

3.1. Hypotézy

- Počet a biomasa žížal se bude v průběhu procesu lišit dle použitého bioodpadu.
- S rostoucí dobou vermikompostování se bude zvyšovat stabilita a zralost vermikompostu.
- Bude nalezen statisticky významný rozdíl v celkovém a přístupném obsahu prvků mezi vrstvami jednotlivých vermikompostovacích zakládek.
- Nejvyšší enzymatická aktivita bude naměřena v horních vrstvách vermikompostovacích zakládek.

3.2. Cíle práce

- Porovnat hodnoty počtu a biomasy žížal v jednotlivých vermikompostovacích zakládkách.
- Vyhodnotit jednotlivé vlastnosti vrstev odlišného stáří a zralých vermikompostů.
- Stanovit a porovnat hodnoty celkového a přístupného obsahu prvků v jednotlivých vrstvách vermikompostovacích zakládek.
- Zjistit, které enzymy a v jakém rozsahu jsou při vermikompostování produkovány.

4. Metodika

4.1. Použité bioodpady

Matolina – Matolina vzniká jako zbytek po rozdrčení, odvodnění a lisování vinných hroznů. Je nejdůležitějším vedlejším produktem vinařského průmyslu. Nejčastěji obsahuje z 50 % slupky hroznů, z 25 % semena a z 25 % stonky (Jin & Kelly 2009).

Lihovarské výpalky v kombinaci se slámou – Lihovarské výpalky jsou kašovitou hmotou, která zbývá ve vařáku destilačního přístroje po oddestilování alkoholu z ovocného kvasu (Obroučka et al. 2010).

Zemědělský bioodpad s kalem ze sladovny – Kal vzniká při sladovnické výrobě a je směsí sladového květu, splávků, odpadní a máčecí vody. Sladový květ vzniká při odkličování sušeného sladu. Je tvořen klíčky a kořínky naklíčeného ječmene. Vzhledem k obsahu bílkovin a vitamínů, lze tento odpad využít jako přísadu do krmiv pro dobytek. Ze zavlažování ječmene vznikají odpadní máčecí vody. Při máčení ječmene vyplouvají na povrch ječmenná zrna tvořící tzv. splávky (Filip & Oral 2002).

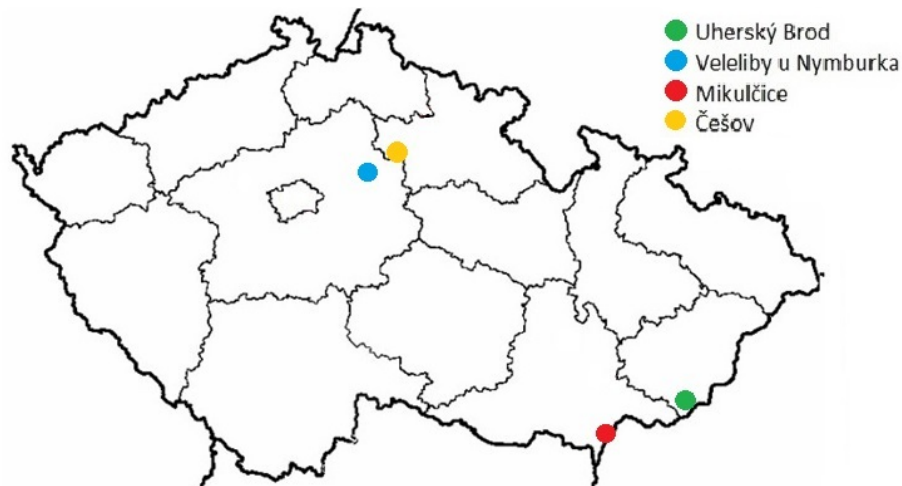
Biologicky rozložitelný komunální odpad (BRKO) - BRKO je odpad z domácností, úřadů a dalších institucí, včetně odděleně sbíraných složek těchto odpadů, jak je uvedeno ve vyhlášce ministerstva životního prostředí č. 93/2016 Sb. o katalogu odpadů.

4.2. Vermikompostování

Vermikompostovací pokusy probíhaly ve venkovních podmínkách v systému pásových hromad, v různých podnicích, podle toho, jaký odpad zde vznikal. Jednalo se o 4 lokality (Obr. 5), a to konkrétně o Uherský Brod, kde byl využit odpad z domácností a zahrad (BRKO), Veleliby u Nymburka, kde se vermikompostoval zemědělský bioodpad s kalem ze sladovny (cca 20 % obj.), dále Mikulčice, kde byl vermikompostován odpad po zpracování révy vinné (matolina), a nakonec Češov, kde se vermikompostoval odpad z výroby pálenky (lihovarské výpalky) spolu se slámou (50:50). Vermikompostování BRKO, zemědělského bioodpadu s kalem ze sladovny a matoliny probíhalo po dobu jednoho roku. Lihovarské výpalky byly spolu se slámou vermikompostovány po dobu dvou let.

Při zakládání vermikompostů byla první umístěna vrstva bioodpadu, poté násada se žížalami *Eisenia andrei* (50 ks/l) a na ni opět vrstva bioodpadu. Každý měsíc byla přidávána nová vrstva bioodpadu o mocnosti 15 – 20 cm, dle metodiky Hanče a Plívy (2013). Zhruba po třech měsících (u zakládky s BRKO; kalem ze sladovny se zemědělským bioodpadem; matoliny), u zakládky s lihovarskými výpalky a slámou po šesti měsících, byly vrstvy odděleny

síťkou (o rozměru ok 0,6 x 0,6 cm), pro lepší identifikaci jejich stáří. U prvních tří zakládek tak vzniklo celkem pět vrstev odlišného stáří a u zakládky s lihovarskými výpalky vrstvy čtyři (Obr. 6).



Obr. 5: Mapa znázorňující polohu jednotlivých lokalit.

Pásová hromada BRKO v lokalitě Uherský Brod byla založena v květnu 2015 o půdorysu 5,6 x 25,5 m. I. vrstva měla jiné vlastnosti než vrstvy následující, neboť se jednalo o násadu se žížalami. Jednotlivé vrstvy vermikompostovací hromady se lišily dle skladby surovin, která byla různorodá v závislosti na ročním období. BRKO byl směsí odpadu ze zahrad a domácností.

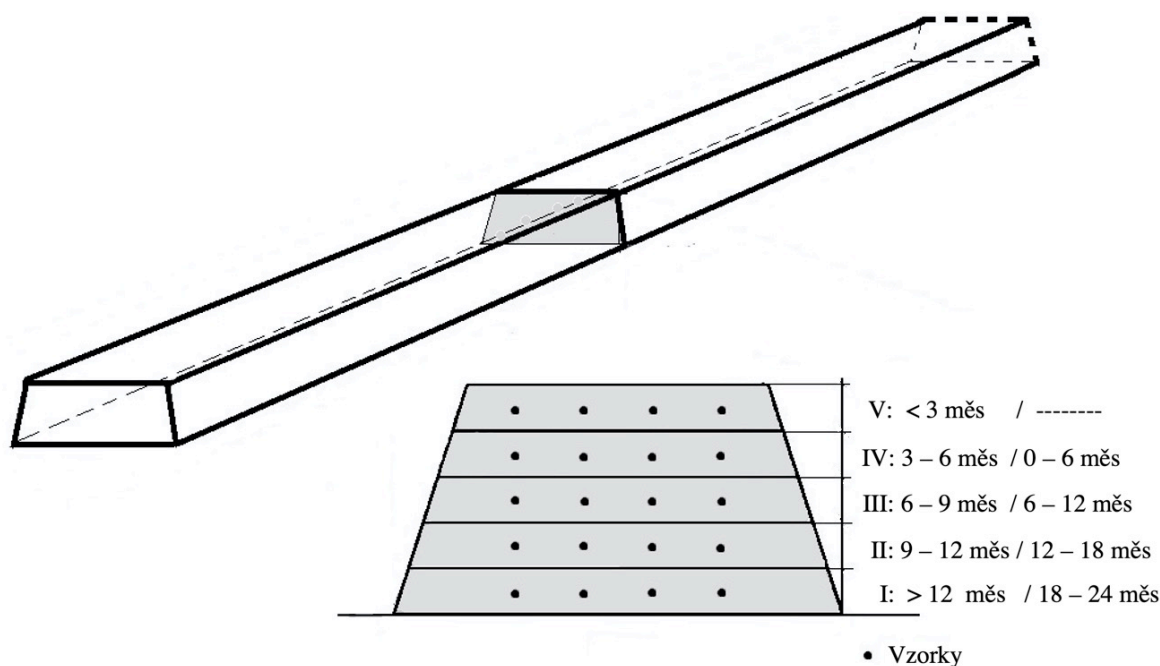
Zemědělský bioodpad s kalem ze sladovny se ve Velelibech u Nymburka vermikompostoval od května 2015 formou pásové hromady o rozměru 6 x 10 m. Kal byl aplikován ve směsi: cca 20 % obj. - kal, 60 % obj. – štěrka, sláma, jablka, tráva a makovina (skladba zemědělského odpadu se lišila v závislosti na ročním období). I. vrstva měla jiné vlastnosti než vrstvy následující, neboť obsahovala násadu se žížalami.

Matolina z vinařství Habánské sklepy (Velké Bílovice) byla vermikompostována na půdorysu 2,5 x 50 m v lokalitě Mikulčice. Vermikompostovací hromada byla založena v květnu 2015. I. vrstva měla jiné vlastnosti než vrstvy následující, neboť obsahovala násadu s žížalami z koňského hnoje.

Lihovarské výpalky se slámou a senem se vermikompostovaly od dubna 2014 do května 2016 na ploše 6 x 8 m na rovném travnatém povrchu v areálu palírny v lokalitě Češov. Složení jednotlivých vrstev se lišilo v závislosti na daném ovoci, které se zpracovávalo

(převážně jablka, hrušky, švestky a třešně). Lihovarské výpalky se vermikompostovaly v kombinaci se slámou v poměru cca 50:50, z důvodu jejich značné tekutosti.

Po roce, u lihovarských výpalků po dvou letech, byly z jednotlivých vermikompostovacích zakládek odebrány vzorky, vždy ve čtyřech opakováních z každé vrstvy tak, aby vzorek reprezentoval danou vrstvu (Obr. 6 – odběr vzorků z vermikompostovací zakládky). Hmotnost každého vzorku byla cca 1 kg. Po odebrání byly z každého vzorku vyselektovány žížaly, které byly spočítány a zváženy, následně byly zmraženy a lyofilizovány pro analýzu obsahu prvků. Vzorek se poté rozdělil na tři části. První část se dala sušit do sušárny na 35 °C pro stanovení sušiny, celkového a přístupného obsahu prvků, N-NH₄⁺, N-NO₃⁻, dostupného organického uhlíku (DOC) a ionto-výměnné kapacity (IEC). Druhá část se skladovala v lednici při 4 °C pro stanovení pH/H₂O a měrné vodivosti (EC). Třetí část vermikompostu byla zmražena v mrazáku při -20 °C a následně lyofilizována pro mikrobiální analýzu a stanovení enzymatické aktivity.



Obr. 6: Schéma odběru vzorků z vermikompostovací zakládky.

4.3. Analýzy

4.3.1. Fyzikálně-chemické analýzy

Sušina byla stanovena gravimetricky na základě rozdílu hmotností před a po usušení vzorku v sušárně při 35 °C. Hodnota pH a měrné vodivosti (EC) byla stanovena ve směsi vzorku s demineralizovanou vodou (1:5, w/v) za použití pH metru WTW pH 340i a konduktometru WTW cond 730 dle normy ČSN EN 15933. Ionto-výměnná kapacita (IEC) byla stanovována ve spolupráci s Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích. K 5 g sušeného namletého vzorku bylo přilito 10 ml HCl (0,1 mol.l⁻¹). Takto vzniklá směs byla umístěna do vodní lázně při 50 °C na 0,5 h. Poté co směs zchladla na laboratorní teplotu byla promyta od chloru na filtračním papíru, dokud se nepřestala tvořit sraženina AgNO₃. Promytá směs byla převedena pomocí demineralizované vody do 250 ml erlenmeyerovy baňky. Pro tvorbu kalibrační křivky se směs titrovala BaOH₂ (0,2 mol.l⁻¹), každou 1 min 0,5 ml za stálého míchání na magnetické míchačce a měření měrné vodivosti do dosažení bodu ekvivalence. Následně se vypočítala iontovýměnná kapacita (IEC) dle Sandhoffa (Váchalová et al. 2014). Pro stanovení celkového dusíku (N_{tot}) a celkového uhlíku (C_{tot}) byl použit CHNS analyzátor Vario MACRO cube (Elementar Analysensysteme GmbH, Německo). V tomto přístroji bylo spáleno v katalytické peci cca 25 – 30 mg sušeného namletého vzorku a následně byly pomocí teplotně-vodivostního detektoru stanoveny hodnoty C a N. Celkový obsah P, K a Mg u sušených namletých vzorků a u lyofilizovaných žížal byl stanoven rozkladem na mokré cestě (8 ml HNO₃ (65 %) + 2 ml H₂O₂ (30 %)) v uzavřeném systému s mikrovlnným ohřevem Ethos 1 (MLS GmbH, Německo). Obsahy N-NH₄⁺, N-NO₃⁻, dostupný organický uhlík (DOC) a přístupný obsah prvků (P, K, Mg) byly stanoveny u sušených namletých vzorků ve výluhu CAT (0,01 mol.l⁻¹ CaCl₂ a 0,002 mol.l⁻¹ kyseliny dietyltriainpentaoctové (DTPA)) v poměru 1:10 (w/v) podle normy ČSN EN 13651. Obsahy N-NH₄⁺, N-NO₃⁻, DOC byly dále měřeny kolorimetricky za použití systému Skalar Sanplus System[®]. Celkové a přístupné obsahy prvků u jednotlivých vzorků i žížal byly měřeny pomocí optického emisního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES, VARIAN VistaPro, Varian, Austrálie).

4.3.2. Biologické analýzy

Bezprostředně po odebrání vzorků byly z každého z nich manuálně vyselektovány žížaly, které byly spočítány a zváženy pro stanovení počtu kusů a biomasy žížal, pak byly zmrazeny a lyofilizovány pro analýzu celkového obsahu prvků (viz výše).

Skupiny mikroorganismů byly stanoveny u lyofilizovaných vzorků pomocí analýzy fosfolipidových mastných kyselin (PLFA) ve spolupráci s Mikrobiologickým ústavem Akademie věd ČR v Praze. Vzorky (0,3 – 0,5 g lyofilizovaného vzorku) byly extrahovány pomocí chloroform-methanol-fosfátového pufru (1:2:0.8; v/v/v) dle Bligha a Dyera (1959). Volné methylestery fosfolipidových mastných kyselin byly analyzovány hmotnostním spektrometrem s tandemovou plynovou chromatografií (GC-MS; 450-GC, 240-MS Varian, Walnut Creek, CA, USA) dle Šnajdra et al. (2008). Methylované mastné kyseliny byly identifikovány podle jejich hmotnostních spekter za použití standardů od firmy Sigma-Aldrich (Šnajdr et al. 2011). Bakterie byly stanoveny na základě i14:0, i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, 16:1 ω 9, 16:1 ω 7, 16:1 ω 5, 10Me-16:0, i17:0, a17:0, cy17:0, 17:0, 10Me-17:0, 18:1 ω 7, 10Me-18:0, cy19:0. Biomasa gram pozitivních bakterií (G+) byla kvantifikována jako suma i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0. Gram negativní bakterie (G–) byly stanoveny dle 16:1 ω 7, 18:1 ω 7, cy17:0, cy19:0, 16:1 ω 5. Pro aktinobakterie byly použity 10Me-17:0, 10Me-18:0, 10Me-16:0 a pro biomasu hub 18:2 ω 6,9. Celková mikrobiální biomasa byla stanovena jako suma všech výše zmíněných markerů spolu s 16:0 a 18:1 ω 9 dle Oravecze et al. (2004) a Šnajdra et al. (2011).

Enzymy (β -D-glukosidáza, kyselá fosfatáza, arylsulfatáza, lipáza, chitináza, celobiohydroláza, alanin a leucin aminopeptidáza) byly stanovovány fluorescenční metodou ve spolupráci s Mikrobiologickým ústavem Akademie věd ČR v Praze na mikrotitračních destičkách s použitím kombinovaného přístroje Tecan Infinite[®] M200. Pro stanovení enzymů se připravila suspenze zhomogenizováním 0,2 g \pm 0,002 g lyofilizovaného vzorku vermikompostu a 20 ml octanového pufru s hodnotou pH 5 o koncentraci $c = 50 \text{ mmol.l}^{-1}$ (1,39 g octanu sodného + 450 μl kyseliny octové + 500 ml destilované vody), po dobu přibližně 30 s pomocí přístroje Ultra-Turrax. Do příslušných jamek v mikrotitrační destičce bylo napipetováno 200 μl zhomogenizovaného vzorku a poté se přidal příslušný substrát (Tab. 5). Mikrotitrační destičky se následně vložily na dobu 5 minut do inkubátoru, vyhřátého na teplotu 40 °C, poté byla pomocí přístroje Tecan Infinite[®] M200 měřena fluorescence daného substrátu. Následně se opět destičky vložily do inkubátoru, na 2 h a znovu se změřila fluorescence. Z rozdílu počáteční a konečné hodnoty se vypočítala enzymatická aktivita, běžně je udávána v mikromolech příslušného substrátu (Tab. 5) za hodinu na jeden gram vzorku (Baldrian 2009; Štursová & Baldrian 2011, Hanč et al. 2018).

Tab. 5: Substráty pro měření fluorescenčních enzymů.

Stanovení	Substrát	Koncentrace [mmol . l ⁻¹]
Kalibrace MUF	MUF = methylumbelliferol	1,00
β-D-glukosidáza	MUFG = 4-methylumbelliferyl-β-D-glucopyranoside	2,75
Kys. fosfatáza	MUFP = 4-methylumbelliferyl-phosphate	2,75
Arylsulfatáza	MUFS = 4-methylumbelliferylsulphate potassium salt	2,50
Lipáza	MUFY = 4-methylumbelliferyl-caprylate	2,50
Chitináza	MUFN = 4-methylumbelliferyl-N-acetylglucosaminide	1,00
Celobiohydroláza	MUFC = 4-methylumbelliferyl-N-cellobiopyranoside	2,50
Kalibrace AMC	AMC = 7-aminomethyl-4-coumarin	1,00
Alanin aminopeptidáza	AMCA = L-alanine-7-amido-4-methylcoumarin	2,50
Leucin aminopeptidáza	AMCL = L-leucin-7-amido-4-methylcoumarin	2,50

Rozpoštědlo: dimethylsulfoxid (DMSO)

Pro stanovení aktivity ureázy byla použita upravená metoda dle Kandelera a Gerbera (1988), která je založena na stanovení obsahu amoniaku po inkubaci směsi lyofilizovaného vzorku s močovinou. Byla vytvořena suspenze smícháním 0,5 g ± 0,005 g zlyofilizovaného vzorku, 4 ml demineralizované vody a 0,25 ml močoviny (0,08 mol.l⁻¹). Takto připravená suspenze se inkubovala 2 h při 37 °C. Po inkubaci bylo do suspenze přilito 5 ml KCl (1 mol.l⁻¹). Suspenze se dále třepala na třepačce po dobu 30 min, následně byla zfiltrována a měřena spektrofotometricky při vlnové délce 690 nm v 30 min reakčním čase proti roztoku KCl (1 mol.l⁻¹) pomocí UV/VIS spektrometru Lambda 25. Stanovení aktivity nitrát reductázy bylo provedeno dle Kandelera (1996). Je založeno na stanovení hladiny dusitanů po inkubaci lyofilizovaného vzorku spolu s dusičnanem. Byla vytvořena suspenze smícháním 0,5 g ± 0,005 g zlyofilizovaného vzorku, 4,5 ml demineralizované vody, 0,4 ml roztoku 2,4 – dinitrofenolu (0,9 mmol.l⁻¹) a 0,1 ml KNO₃ (0,025 mol.l⁻¹). Suspenze byla umístěna na 24 h do inkubátoru při 25 °C. Po inkubaci bylo do suspenze přidáno 10 ml KCl (4 mol.l⁻¹), následně byla suspenze zfiltrována a měřena spektrofotometricky při vlnové délce 520 nm a 15 min v reakčním čase proti standardu (1000 μg NO₂-N.ml⁻¹), pomocí UV/VIS spektrometru Lambda 25.

4.3.3. Statistické analýzy

Byly provedeny analýzy normality (Kolmogorův-Smirnovův, Lillieforsův, Shapiro-Wilkův W test) a homogenity (Cochranův, Hartleyův, Bartlettův test). Na základě výsledků normality a homogenity byla zvolena analýza rozptylu jednofaktorová ANOVA následovaná

Tukeyho HSD testem ($p \leq 0,05$) za použití softwaru Statistica 12 CZ (StatSoft, Tulsa, USA).
Analýzy vícenásobné lineární regrese a korelace – Pearsonův korelační koeficient ($p \leq 0,05$),
byly provedeny pomocí softwaru IBM® SPSS Statistics® (SPSS, Chicago, USA).
Analýza hlavních složek (PCA) byla provedena za použití softwaru Minitab 16 verze 2.2.0
(Minitab Inc., Pensylvanie, USA).

5. Publikované práce

5.1. Hanč, A., Částková (Hřebečková), T., et al. (2017). Dynamika vermikompostování v systému pásové hromady s vertikálním doplňováním

Název: Dynamics of a vertical-flow windrow vermicomposting system

Autoři: Aleš Hanč, Tereza Částková (Hřebečková), Stanislav Kužel, Tomáš Cajthaml

Publikováno v časopise: Waste Management & Research. 35, 1121-1128

Informace o časopise: IF= 1,803 (2016); Sage; ISSN: 0734-242X

Dynamics of a vertical-flow windrow vermicomposting system

Ales Hanc¹, Tereza Castkova¹, Stanislav Kuzel²
 and Tomas Cajthaml^{3,4}

Abstract

Large-scale vermicomposting under outdoor conditions may differ from small-scale procedures in the laboratory. The present study evaluated changes in selected properties of a large-scale vertical-flow windrow vermicomposting system with continuous feeding with household biowaste. The windrow profile was divided into five layers of differing thickness and age after more than 12 months of vermicomposting. The top layer (0–30 cm, age <3 months) was characterised by partially decomposed organic matter with a high pH value and an elevated carbon/nitrogen (C/N) ratio. The earthworm biomass was 15 g kg⁻¹ with a population density of 125 earthworms per kilogram predominantly found in clusters. The greatest amount of fungi (3.5 µg g⁻¹ dw) and bacteria (62 µg g⁻¹ dw) (expressed as phospholipid fatty acid analysis) was found in this layer. Thus, the top layer could be used for an additional cycle of windrow vermicomposting and for the preparation of aqueous extracts to protect plants against diseases. The lower layers (graduated by 30 cm and by 3 months of age) were mature as reflected by the low content of ammonia nitrogen, ratio of ammonia to nitrate nitrogen and dissolved organic carbon, and high ion-exchange capacity and its ratio to carbon. These layers were characterised by elevated values for electrical conductivity, total content of nutrients, available magnesium content, and a relatively large bacterial/fungal ratio. On the basis of the observed properties, the bottom layers were predetermined as effective fertilisers.

Keywords

Large-scale windrow vermicomposting, continuous feeding, biowaste, earthworms, micro-organisms

Received 14th January 2017, accepted 13th July 2017 by Associate Editor Dave Ross.

Introduction

An attractive alternative to thermophilic composting is to use epigeic species of earthworms to break down organic wastes and turn them into vermicompost (Edwards, 2011). There are small-scale and large-scale systems of vermicomposting based on the desired processing capacity. The small-scale vermicomposting systems are suitable for households and offices. The large-scale systems require large volumes of wastes and are mainly used for commercial purposes (Benítez et al., 2002). There are three main large-scale vermicomposting system methods, which are classified as: flow through, beds, and windrow. The windrow system uses linear long piles on the ground that contain organic material. They can be open or under a cover that consists of a bedding material for earthworms and organic matter to prevent the predation of earthworms. Even though the windrow method has no physical borders, the earthworms remain in the piles owing to the large amount of organic material available. In the case of horizontal flow, the fresh organic matter is added from both the front and back sides of the pile. When the decomposition process is completed, the vermicompost can be removed (Singh and Singh, 2014). Our study focused on the large-scale vertical-flow system. The system is widely used for large-scale vermicomposting in the Czech Republic and neighbouring countries. It consists of the

gradual addition of vertical layers of biowaste that conserves space (Hanc and Pliva, 2013).

Vermicomposting studies published in the scientific literature are mostly conducted in small-scale systems with one-time feeding. Abbasi et al. (2015) briefly characterised 96 experiments with vermicomposting of phytomass (e.g. garden and kitchen waste, vegetable and fruit waste, grasses, pruning waste, flower waste, greenhouse waste, etc.) conducted under laboratory or small-scale conditions. Small containers and periodic sampling

¹Department of Agro-Environmental Chemistry and Plant Nutrition, Czech University of Life Sciences Prague, Czech Republic

²Department of Agroecosystems, University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Czech Republic

³Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Czech Republic

⁴Institute for Environmental Studies, Charles University in Prague, Czech Republic

Corresponding author:

Ales Hanc, Department of Agro-Environmental Chemistry and Plant Nutrition, Czech University of Life Sciences Prague, Kamycka 129, 165 21 Prague 6, Czech Republic.
 Email: hanc@af.czu.cz

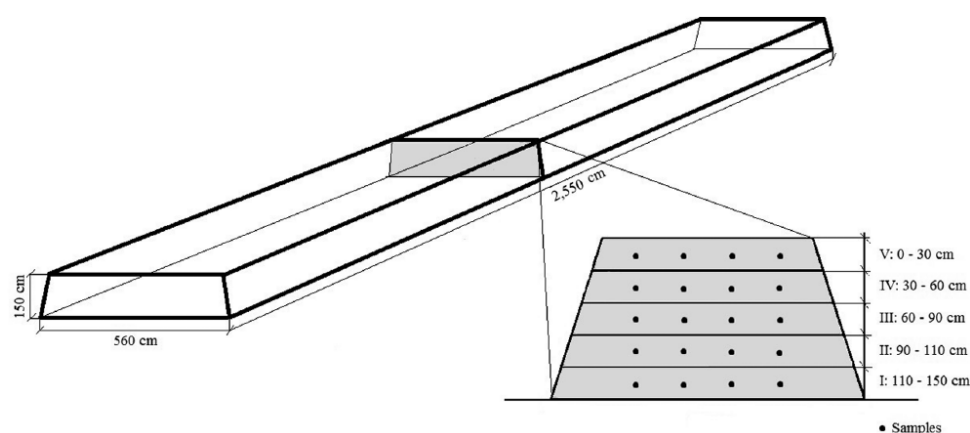


Figure 1. Diagram of the large-scale vermicomposting at the Rumpold UHB waste management company, Uherský Brod, Czech Republic.

might have a negative impact on the living conditions of the earthworms. Additionally, the results achieved in laboratory experiments may differ from practical large-scale vermicomposting that is influenced by the settling of the vermicomposted materials and climate conditions.

The objective of this study was to evaluate selected properties of a large-scale vertical-flow windrow vermicomposting system with continuous feeding with household biowaste operated on a hard surface under outdoor conditions. The study sought to contribute to the understanding of the processes occurring in this vermicomposting system. The results obtained are expected to be helpful for companies that process municipal biowaste in large-scale systems, as well as for vermicompost users.

Materials and methods

Layout and procedure

The experiment was conducted under large-scale vermicomposting conditions at the Rumpold UHB waste management company, Uherský Brod, Czech Republic (49°02'53.5"N 17°38'57.0"E). Household biowaste originating from apartment buildings and housing areas is vermicomposted here. The typical composition of household biowaste generated in four seasons typical for the Czech Republic and temperate climate is described in detail in a previous study (Hanc et al., 2011).

Windrow vermicomposting was set up in May 2015 on a ground plan of 5.6 m × 25.5 m placed on a flat asphalt surface (Figure 1). The bedding with biowaste was placed first. The bedding was then inoculated with earthworms using the top layer from another windrow with a density of about 50 earthworms (*Eisenia andrei*) per litre. Next, layers were added every 3 weeks in spring, summer, and autumn, with the height of the added layers being 30 cm. The winter season was an exception because an activity of earthworms was lower. The interval was extended to 5 weeks and the height of the layers was 50 cm to avoid cold conditions for the earthworms. The biowaste used

was thermophilically pre-composted for 2 weeks in open windrows so as to: (1) achieve a certain degree of homogenisation of the feedstock components; (2) obtain feed with an acceptable temperature for earthworms; and (3) obtain partially decomposed and more palatable feed (Ndegwa and Thompson, 2001).

Samples were taken up from cross profiles of different depths and ages in the four replications given below:

V: 0–30 cm, <3 months

IV: 30–60 cm, 3–6 months

III: 60–90 cm, 6–9 months

II: 90–120 cm, 9–12 months

I: 120–150 cm, >12 months

Each sample was collected to characterise the entire respective height range. The weight of each primary sample was about 5 kg. The sample was subjected to quartering to achieve 1 kg of homogenised sample. Potential earthworms were separated, counted, weighted, and lyophilised. The resulting vermicompost sample was divided into three parts and treated as required for laboratory analyses. One part of the vermicompost sample was stored in a refrigerator at 4 °C until the pH and electrical conductivity (EC) could be determined. The second part was dried at 30 °C to a constant weight and ground. This was then used for analyses of the total and available content of elements and ion exchange capacity. The final portion of the vermicompost sample was frozen and then lyophilised. This was subsequently used for the determination of the groups of micro-organisms.

Chemical and biological analyses

The pH and EC measurements were conducted on samples mixed with deionised water (1:5 w/v wet basis) using a WTW pH 340 i and Testo 240, respectively, according to EN 13037

Table 1. Selected agrochemical parameters of different layers in the large-scale vertical-flow windrow vermicomposting system. Values are the means \pm SD ($n=4$). Different letters within a column indicate significant differences between the values based on Tukey's test.

Layer	Dry matter [%]	pH/H ₂ O	EC [μ S cm ⁻¹]	C _{tot} [%]	N _{tot} [%]	C/N
V	40.16 \pm 2.19 ^a	8.70 \pm 0.13 ^b	1824 \pm 139.43 ^a	24.17 \pm 1.27 ^c	1.53 \pm 0.21 ^a	16.07 \pm 3.10 ^c
IV	34.95 \pm 1.64 ^c	8.75 \pm 0.07 ^b	2041 \pm 367.99 ^a	21.50 \pm 2.75 ^{bc}	1.54 \pm 0.17 ^a	13.99 \pm 1.15 ^{bc}
III	46.57 \pm 1.09 ^b	7.49 \pm 0.11 ^a	3640 \pm 318.01 ^b	17.24 \pm 0.55 ^a	1.67 \pm 0.06 ^a	10.34 \pm 0.16 ^a
II	43.76 \pm 0.69 ^b	8.11 \pm 0.09 ^c	2076 \pm 319.54 ^a	17.16 \pm 1.53 ^a	1.62 \pm 0.05 ^a	10.64 \pm 1.23 ^{ab}
I	40.44 \pm 0.54 ^a	7.45 \pm 0.10 ^a	2317 \pm 197.88 ^a	18.14 \pm 1.31 ^{ab}	1.75 \pm 0.03 ^a	10.38 \pm 0.76 ^a

V: 0–30 cm, <3 months; IV: 30–60 cm; 3–6 months; III: 60–90 cm; 6–9 months; II: 90–120 cm; 9–12 months; I: 120–150 cm, \rightarrow 12 months; EC: electrical conductivity; C_{tot}: total carbon; N_{tot}: total nitrogen; C/N: carbon/nitrogen ratio.

(1999). Total carbon (C_{tot}) and nitrogen (N_{tot}) were determined using the CHNS Vario MACRO cube analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH, Germany). In this instrument, about 25 mg of the sample was burned in a catalytic furnace, and subsequently C_{tot} and N_{tot} were determined by using a thermal conductivity detector. The total element contents (phosphorus, potassium, and magnesium) were determined in digests obtained by pressurised wet-ashing (HNO₃ + HCl + HF) in an Ethos 1 microwave system (MLS GmbH, Leutkirch im Allgäu, Germany). The contents of ammonium nitrogen (NH₄⁺-N), nitrate nitrogen (NO₃⁻-N), dissolved organic carbon (DOC), and the available portions of phosphorus, potassium, and magnesium were determined in calcium chloride/DTPA (CAT) solution (0.01 mol L⁻¹ CaCl₂ and 0.002 mol L⁻¹ diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA)) at a ratio of 1:10 (w/v) according to the International BSI Standard EN 13651 (2001). The NH₄⁺-N and NO₃⁻-N contents in the extracts were measured colorimetrically using a SKALAR SANPLUS SYSTEM® (The Netherlands). The element concentrations were determined using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES, VARIAN VistaPro, Varian, Australia) with axial plasma configuration. The ion-exchange capacity (IEC) was determined conductometrically as described by Váchalová et al. (2014). Samples for the phospholipid fatty acid (PLFA) analysis were extracted in triplicate using a mixture of chloroform, methanol, and phosphate buffer (1:2:0.8; v/v/v) according to Bligh and Dyer (1959). The extracts were analysed by tandem gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS; 450-GC, 240-MS Varian, Walnut Creek, CA, USA). Methylated fatty acids were identified according to their mass spectra using a mixture of chemical standards obtained from Sigma–Aldrich, Prague, Czech Republic and Matreya LLC, USA. Bacteria were determined on the basis of 17:0, 16:1 ω 9, 15:0, and 16:1 ω 7. Biomass gram positive (G⁺) bacteria were quantified as the sum of i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, and a17:0. The gram negative (G⁻) bacteria were determined on the basis of 16:1 ω 7, 18:1 ω 7, cy17:0, cy19:0, 16:1 ω 5, 10Me-17:0, 10Me-18:0, 10Me-16:0 were used for actinobacteria, and 18:2 ω 6,9 for fungi. The total biomass was quantified as the sum of all of the markers together with 16:0 and 18:1 ω 9 (Šnajdr et al., 2011). The labelling is a typical for this research field (Oravec et al., 2004).

Statistical analysis

Statistical analyses of variance were performed using the STATISTICA 13.2 software (StatSoft, Tulsa, USA). A one-way analysis of variance using a 95% confidence level followed by Tukey's test was performed. Spearman's correlations were explored between the agrochemical and biological parameters at the 0.05 probability levels. Principal component analysis (PCA) was carried out using Minitab 16 version 2.2.0 (USA).

Results and discussion

Chemical parameters

The dry matter content and selected properties of individual vermicompost windrow layers are shown in Table 1. The greatest dry matter content was found in the 60–120 cm depth. The bottom layer showed a low dry matter content and thus high humidity, which was probably caused by the absorption of rainwater retained on the asphalt surface. A similar dry matter content (40%) was also observed in the upper portion of the windrow, which was affected by rainfall and the evaporation of water. The low amount of transformation of the organic matter caused the flow of rainwater through the top layer into the layer at 30 to 60 cm, hence layer IV had the lowest dry matter content and showed a statistically significant difference when compared with all of the other layers.

The observed pH was in the alkaline range with an average value of 8.1. The upper layers differed significantly from the lower layers. The higher pH in the two upper layers could be caused by the use of pre-composted feedstocks and the presence of earthworms. The lower pH values in the lower layers were probably due to the prevailing anaerobic conditions in the absence of earthworms and the formation of fatty acids. Singh et al. (2005) investigated changes in pH in mixed vegetable residues with different initial substrate pH values (4.3–6.9) in a laboratory experiment with and without earthworms. The maximum substrate pH was 8.2 in the experiments with initial pH values of 4.8 and 5.2, while it was 8.3 in their controls without earthworms after 6 and 15 days of composting. The substrate pH attained a declining trend thereafter, and was neutral after 30 days of vermicomposting. The controls without earthworms showed pH

values 6.8 and 6.9 even after 30 days of aerobic composting. The increasing rate of substrate pH was observed to be greater than the decreasing rate.

Earthworms are very sensitive to salt content (expressed as salinity or EC) in the substrate and prefer a salt content of approximately 0.5% (Gunadi et al., 2002). In our experiment, the EC ranged from 1.8 mS cm^{-1} in the top layer to 3.6 mS cm^{-1} in the middle layer. The increase in the EC was indirectly proportional to the decline in the pH ($R = -0.64$, $p < 0.05$) and could be explained by release of the bounded elements during digestion of earthworms together with loss of organic matter (Garg et al., 2006). This is in agreement with our experiment where EC negatively correlated with C_{tot} ($R = -0.59$, $p < 0.05$). A decrease of EC was found in the lower layers. It could be caused by runoff of the leachate during large-scale vermicomposting under outdoor conditions. This assumption is consistent with Hanc and Pliva (2012) who vermicomposted garden biowaste in a laboratory experiment with one-time feeding. The leachate that was captured in stainless trays was returned to the vermicomposted materials to achieve a closed loop. The initial EC was about 2 mS cm^{-1} , and after 1 month the EC increased to 3 mS cm^{-1} and fluctuated at about this level for the next 4 months.

The greatest C_{tot} content was found in the upper layer and gradually decreased with depth. The gradual decline was attributed to the loss of volatile solids in the form of CO_2 . The N_{tot} content increased with the age and depth of the layer, but the changes were not statistically significant. The C/N ratio was greatest in the top layer with a value of 16. This relatively low ratio could be explained by the use of pre-composted feedstock and intensive mineralisation made by earthworms and microorganisms. The portion of the windrow from the middle to the bottom showed the same stable C/N ratio (slightly above 10), which is a sign that the process of vermicomposting is virtually completed. Similarly, Taeporamaysamai and Ratanatamskul (2016) found the C/N ratio of final vermicomposts based on kitchen and vegetable market waste in the range of 13.0–14.3. They concluded that the C/N ratio below 15 is preferable for agronomic use of vermicompost.

The total contents of macro-elements, such as phosphorus, potassium, and magnesium (Figure 2), increased with the age of the vermicomposted material, which was associated with the loss of organic matter (Dominguez and Gómez-Brandón, 2013). The average ratios of the total contents of elements in the bottom layer and the top layer increased in the following order: Magnesium (1.32-fold), potassium (1.36-fold), and phosphorus (2.61-fold). The content of total elements in the entire windrow profile was in the ranges of: Phosphorus (0.25%–0.65%), potassium (1.2%–1.7%), and magnesium (0.4%–0.6%). Pattnaik and Reddy (2010) observed 0.9% phosphorus, 0.8% potassium, and 0.9% magnesium in vermicompost from vegetable market waste and 0.6% phosphorus, 0.3% potassium, and 0.6% magnesium in vermicompost from floral waste after 60 days of vermicomposting by *Eisenia fetida*. The total phosphorus content found in the vermicompost in this study was comparable with the total phosphorus content in

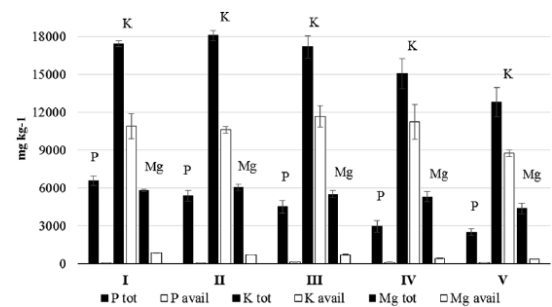


Figure 2. Changes in total and available phosphorus, potassium, and magnesium contents (mg kg^{-1}) in layers I–V of the large-scale vertical-flow windrow vermicomposting system. The values are the means \pm SD ($n = 4$).

vermicompost derived from dairy manure–waste paper mixtures (0.6%) and separated cattle solids (0.4%), but was lower than in vermicompost based on separated pig solids (1.7%), chicken solids (2.7%), and duck solids (2.9%), as was reported by Mupondi et al. (2011) and Edwards and Burrows (1988).

The available phosphorus showed an initially increasing and then a decreasing trend. In the case of the available potassium, there was no significant variation between the layers. The available magnesium content gradually increased from an initial content of 390 mg kg^{-1} to a final content of 850 mg kg^{-1} . The proportion of the available content in the total content ranged in the whole profile from 1% to 5% for phosphorus, 58% to 75% for potassium, and 8% to 15% for magnesium. The available content of phosphorus, potassium, and magnesium in vermicomposts based on apple pomace constituted approximately 16%, 62%, and 15% of the total contents, respectively, and these values were 60%, 45%, and 25% greater than in the control composts (Hanc and Chadimova, 2014).

Maturity and stability

The maturity of composts or vermicomposts can be expressed by parameters such as $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$, DOC, IEC, and $\text{IEC}/C_{\text{tot}}$ as shown in Table 2 (Bernal et al., 2009). Mineral nitrogen forms ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$) play an important role in the use of vermicompost as a fertiliser. During the process of vermicomposting, the earthworms usually enhance nitrogen mineralisation, so the mineral is retained primarily in the nitrate form (Atiyeh et al., 2000). Mucus, nitrogenous excretory substances, growth stimulating hormones, and enzymes that contain different forms of nitrogen can be added by earthworms into vermicompost during their fragmentation and digestion. In addition, the action of free living nitrogen-fixing bacteria can contribute to a greater diversity of the content and forms of nitrogen (Gupta and Garg, 2009). Immature vermicomposts can contain high levels of ammonium nitrogen and ammonia, which may reduce the germination and root development of plants. In this study, the lowest ammonium nitrogen content ($23.8 \text{ mg NH}_4^+\text{-N kg}^{-1}$) was found in the bottom layer, which contained the oldest vermicompost. In

Table 2. Effect of depth and age of the vermicompost windrow profile on selected maturity indicators. The values are the means \pm SD ($n=4$). Different letters within a column indicate significant differences between the values based on Tukey's test.

Layer	NH ₄ ⁺ -N (mg kg ⁻¹)	NH ₄ ⁺ -N/ NO ₃ ⁻ -N	DOC (mg kg ⁻¹)	IEC (mmol ₊ 100g ⁻¹)	IEC/C _{tot}
V	49.30 \pm 5.27 ^a	12.99 \pm 14.16 ^a	6981.32 \pm 661.81 ^{ab}	n.d.	n.d.
IV	45.94 \pm 1.45 ^a	6.33 \pm 8.35 ^a	7984.87 \pm 935.80 ^b	52 \pm 8.29 ^a	2.44 \pm 0.43 ^b
III	72.62 \pm 7.12 ^c	0.03 \pm 0.01 ^a	7156.08 \pm 129.16 ^{ab}	53 \pm 8.83 ^a	3.09 \pm 0.59 ^{ab}
II	41.00 \pm 8.33 ^a	0.06 \pm 0.02 ^a	6089.21 \pm 711.09 ^a	60.75 \pm 3.86 ^a	3.56 \pm 0.41 ^a
I	23.81 \pm 6.24 ^b	0.05 \pm 0.02 ^a	4584.13 \pm 174.71 ^c	60.50 \pm 2.38 ^a	3.35 \pm 0.21 ^a

V: 0–30 cm, <3 months; IV: 30–60 cm; 3–6 months; III: 60–90 cm; 6–9 months; II: 90–120 cm; 9–12 months; I: 120–150 cm, \rightarrow 12 months. DOC: dissolved organic carbon; IEC: ion-exchange capacity; n.d.: not detectable.

the above layers, the contents were slightly greater but did not exceed 75 mg kg⁻¹, indicating a mature compost according to Thompson et al. (2003). The NO₃⁻-N content was 17-fold greater than the NH₄⁺-N content. Greater contents were found in the lower half of the windrow profile. The average proportion of NH₄⁺-N in the N_{tot} was 0.3% and the proportion of NO₃⁻-N was 4.8%. The maturity parameter NH₄⁺-N/NO₃⁻-N was indirectly proportional to the age of the vermicomposted material. Despite a large difference in the parameter between the two upper layers and the lower three layers, no statistical significance was found that could be caused by the large standard of deviation in the NO₃⁻-N content. This is in agreement with Hanc et al. (2017) who found the greatest variation to be in NO₃⁻-N among 10 monitored parameters during the composting process. There is still no threshold level of NH₄⁺-N/NO₃⁻-N for stabile vermicompost, however, a value of <1.0 was suggested for this parameter for mature compost (Abouelwafa et al., 2008; Ko et al., 2008), and <1.9 for a mature compost composed of a woodchip base (Benito et al., 2003). Additionally, it is noteworthy that the gradually decreasing content of nitrates below layer III suggests prevailing anoxic conditions and the nitrate decrease was caused by nitrate reducing bacteria. This fact could explain the complete disappearance of the earthworms from layer I (see below).

DOC is the most active fraction of carbon and its concentration is recommended as a simple method of determining compost maturity (Wu et al., 2000). The greatest DOC value was found in layer IV. There were no statistical differences among the layers, with the exception of layer I, in which the lowest value of 0.45% was observed, and this was significantly different when compared with the DOC values present in the other layers. This is in accordance with Zmora-Nahum et al. (2005) who recommended 4 g kg⁻¹ as a threshold level indicating maturity, however, Hue and Liu (1995) suggested a greater limit of 1.0%. Aira et al. (2006), who vermicomposted two pig slurries that differed in their C/N ratios, found that aging produced a significantly strong decrease in the DOC levels in both treatments. These reductions were greater in the elevated C/N ratio treatment, resulting in a significant association between the age of the layers and the C/N ratio of the treatments. This depletion of DOC was more intense in the presence of earthworms.

Mineralisation and humification occur during aerobic processes, which may be reflected by the changes in the ion-exchange

properties. For this reason, the IEC should be included among the indicators evaluating compost and vermicompost maturity. Reasonable IEC values with a classically shaped curve were not detected in layer V, which contained little processed primary organic matter without adsorption capacity for ions. IEC values ranged from 52 mmol₊ 100 g⁻¹ in layers IV and III, to 60 mmol₊ 100 g⁻¹ in the older layers (II and I), but with no statistical differences. The values observed were greater than in a previous study utilising peat (28.8 mmol₊ 100 g⁻¹), and garden compost (35.2 mmol₊ 100 g⁻¹), but lower than a synthetic cation exchanger (90.5 mmol₊ 100 g⁻¹) as determined by Váchalová et al. (2014). Mature vermicompost should have significant sorption and ion-exchange properties, and release nutrients gradually to optimise the composition of the soil solution. Harada and Inoko (1980) and Iglesias-Jimenez and Perez-Garcia (1992) suggested a cation exchange capacity of >60 mmol₊ 100 g⁻¹ and >67 mmol₊ 100 g⁻¹, respectively, for mature compost derived from municipal solid waste.

The IEC/C_{tot} ratio takes into account the mineralisation of organic matter. The parameter increased to a depth of 120 cm, with values ranging from 2.4 to 3.5, which is greater than the value of 1.7 suggested by Roig et al. (1988) for mature compost.

Earthworms

The properties of the earthworms utilised in the current study are shown in Table 3. The earthworms were found in clusters, which is typical for the large-scale vermicomposting of household bio-waste characterised by high heterogeneity (Hanc et al., 2011). The greatest number of earthworms were found in the top layer (88.5% of the total), followed by layer II (5.9%), layer IV (3.8%), and layer III (1.8%). A similar situation was found in the case of the earthworm biomass: Top layer (89.2% of the total from all of the layers), layer II (4.9%), layer IV (4.2%), and layer III (1.7%). The earthworms in layers IV, III, and II lived in random clusters using air space with the still undecomposed matter. The average weight of one earthworm ranged from 0.10 to 0.13 g and there were no significant differences among the layers. No earthworms were found in the oldest layer (I) owing to the completed transformation of the organic matter and thus lack of food for earthworms, and anoxic conditions.

The earthworms contained an average of 0.74% phosphorus, 0.65% potassium, and 0.12% magnesium. The contents of

Table 3. Population, biomass, and selected nutrient parameters of earthworms in the vermicompost windrow layers.

Layer	Number (in 1 kg)	E. biomass (g kg ⁻¹)	P _{tot} (mg kg ⁻¹)	K _{tot} (mg kg ⁻¹)	Mg _{tot} (mg kg ⁻¹)
V	125 ± 81.92	14.94 ± 8.93	7438 ± 177	6645 ± 390	1443 ± 235
IV	5.42 ± 7.86	0.70 ± 0.92	7432 ± 135	6605 ± 196	1058 ± 40
III	2.50 ± 3.97	0.29 ± 0.42	7414 ± 1255	6793 ± 1025	1075 ± 303
II	8.33 ± 13.54	0.82 ± 1.32	7350 ± 427	6012 ± 757	1213 ± 180
I	0 ± 0	0 ± 0	n.d.	n.d.	n.d.

V: 0-30 cm, < 3 months; IV: 30-60 cm; 3-6 months; III: 60-90 cm; 6-9 months; II: 90-120 cm; 9-12 months; I: 120-150 cm, →12 months.
E. biomass: Earthworm biomass; n.d.: not detectable.

elements in the earthworms tended to decline slightly towards the lower layers, wherein the total contents of elements in the vermicomposted materials increased in the same direction (for phosphorus: $R=-0.91$, $p<0.05$; for potassium: $R=-0.50$, $p<0.05$, and for magnesium: $R=-0.65$, $p<0.05$). This indicates considerable uptake of the macro-elements by the earthworms, however, it is necessary to take into account the loss of organic matter as well as the leakage and movement of earthworms through the profile. The phosphorus content in the earthworms was greater by 311% and 8681% than the P_{tot} and P_{avail}, respectively, in the vermicomposted materials of the windrow layers. On the contrary, the potassium content in the earthworms constituted 42% and 62% of the K_{tot} and K_{avail} determined in the layers. In the case of magnesium, it was 23% and 232% of the Mg_{tot} and Mg_{avail}.

Earthworms can serve as animal feed, especially for fish and poultry (Edwards and Niederer, 2011; Hamid et al., 2016). Earthworms with a high content of phosphorus found in our experiment could be used in feed mixtures for animals as a substitute for phosphate rocks that are gradually depleting (Tarayre et al., 2016).

With the development of biomedicine, scientists have rediscovered the medicinal value of earthworms related to many chemical components, including (1) earthworm proteases, (2) metal-binding protein, (3) other active proteins including those with proliferative improving activity, (4) active peptides, (5) earthworm metabolites, (6) special organic acids, and (7) other components such as purin, vitamin B, tyrosine, and selenium (Li et al., 2011).

Micro-organisms

There were differences among the microbial decomposer communities in the vermicomposting windrow, as revealed by the PLFA (Figure 3). In an attempt to find correlations of the microflora, earthworm biomass, and other relevant parameters, we performed PCA of the results from the vermicomposting. The results are shown in Figure 4. The first two principal components explained 53.0% and 25.3% of the total variability of the data. The PCA results clearly indicate strong correlation between the earthworm biomass and all the groups of micro-organisms.

Generally, the microbial biomass tended to decrease during the vermicomposting course represented by the individual layers. For instance, the concentration of the PLFA representing fungi

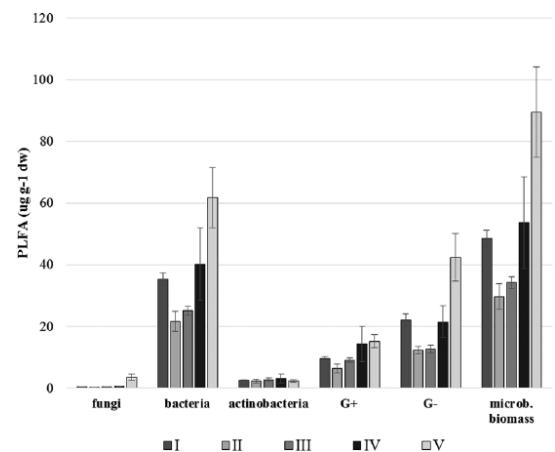


Figure 3. Changes in fungal PLFAs, bacterial PLFAs, and total microbial PLFAs biomass in the layers of the large-scale vertical-flow windrow vermicomposting system. The values are the means ± SD ($n=4$). PLFA: phospholipid fatty acid.

ranged from 0.2 to 3.5 µg kg⁻¹ dw and the concentration in the top layer was 11.5-fold greater compared with the lowest layer. Similarly, in a previous study, the microbial PLFA decreased throughout the layers during the 250-day long vermicomposting of rabbit manure (Gómez-Brandón et al., 2013). However, regarding the profile of the bacterial biomass, the bacteria gradually decreased only until layer II with a slight increase in layer I. Since the results of nitrate concentrations indicate possible anoxic conditions, the elevated biomass could be caused by anaerobic bacteria based on *cyp17:0*, *cyp19:0*, and *18:1w9* (Němeček et al., 2016). The data emphasize further research regarding this phenomenon.

The lowest value for the bacterial/fungal ratio (17) was found in the top layer, and this value substantially increased to 75 in layer IV. In the intermediate and lower layers, the parameter fluctuated at approximately 93 ± 19 with a peak value of 111 in layer II. Based on qPCR, Castillo et al. (2013) found that the bacterial/fungal abundance ratio tended to decrease with time during the vermicomposting of a winery substrate (W) – (255 in the 1st week, 204 in the final vermicompost after 15 weeks), but increased significantly in an olive-mill substrate mixed with goat manure at a 4:1 ratio (dw:dw) (O) – (95 in the 1st week, 365 in

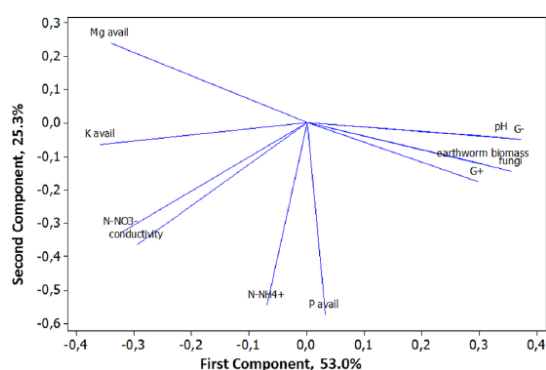


Figure 4. PCA of the chemical and biological variables in the layers of the large-scale vertical-flow windrow vermicomposting system. Percentage of variability explained by each principal component is shown between parentheses after each axis legend.

the final vermicompost after 18 weeks). This was owing to a similar reduction of bacteria and fungi with respect to the initial population in the W substrate (95% and 93%, respectively), while the O substrate showed a more severe decline in fungal abundance with respect to bacterial abundance (94% and 77%, respectively). Bacteria and fungi are considered important dietary sources for earthworms, and therefore, the digestion of the organic wastes by them would have a negative effect on the total bacterial and fungal abundance. However, Sen et al. (2008) observed that the total bacterial abundance remained constant during the vermicomposting of industrial sugar wastes. On the contrary, Pramanik and Chung (2011) observed an increase in the total number of bacteria and fungi during the vermicomposting process. These contrasting results may be related to the available carbon. Tiunov and Scheu (2004) reported a strong decrease in microbial biomass under carbon-limited conditions, where earthworms and micro-organisms compete for easily available carbon. In the current study, a slight correlation was found between the course of DOC and fungi ($R=0.18$) and DOC and bacteria ($R=0.19$) in the windrow layers.

Conclusions

The results achieved in the large-scale vermicomposting of household biowaste with continuous feeding in a vertical-flow system were affected by influences that do not occur in laboratory conditions. The top layer was characterised by an elevated pH value, C_{tot} , C/N ratio, and also by a high density of earthworms, fungi, and bacteria. The lower layers were mature as reflected by the low contents of N-NH_4^+ , $\text{NH}_4^+/\text{N-NO}_3^-$, and DOC, and elevated values for the IEC and the $\text{IEC}/C_{\text{tot}}$ ratio. These layers were characterised by large values for the EC, total content of nutrients, the available content of magnesium, and a relatively large bacterial/fungal ratio. Owing to the ease of separation of the layers using a loader, the top layer could be used for a new vermicomposting windrow, and for the preparation of

aqueous extracts to protect plants against diseases. The separated earthworms are conveniently utilised as feed for fish and poultry, and are also utilised in the production of pharmaceutical products. The bottom layers are predetermined to be useful as effective fertiliser, or as components of commercial potting media, and for the remediation of contaminated soils and waste waters.

Acknowledgements

The authors would like to thank Vera Horakova from Rumpold Uhersky Brod for experiment maintenance and Christina Baker Starman for revision of the English text.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic under NAZV project No. QJ1530034 and by CULS Prague under CIGA project No. 20172018.

References

- Abbasi SA, Nayeem-Shah M and Abbasi T (2015) Vermicomposting of phytomass: Limitations of the past approaches and the emerging directions. *Journal of Cleaner Production* 93: 103–114.
- Aira M, Monroy F and Domínguez J (2006) C to N ratio strongly affects population structure of *Eisenia fetida* in vermicomposting systems. *European Journal of Soil Biology* 42: S127–S131.
- Abouelwafa R, Ait Baddi G, Souabi S, et al. (2008) Aerobic biodegradation of sludge from the effluent of a vegetable oil processing plant mixed with household waste: Physical-chemical, microbiological, and spectroscopic analysis. *Bioresource Technology* 99: 8571–8577.
- Atiyeh RM, Domínguez J, Subler S, et al. (2000) Changes in biochemical properties of cow manure during processing by earth-worms (*Eisenia andrei*, Bouché) and the effects on seedling growth. *Pedobiologia* 44: 709–724.
- Benítez E, Sainz H, Melgar R, et al. (2002) Vermicomposting of a lignocellulosic waste from olive oil industry: A pilot scale study. *Waste Management & Research* 20: 134–142.
- Benito M, Masaguer A, Moliner A, et al. (2003) Chemical and microbiological parameters for the characterisation of the stability and maturity of pruning waste compost. *Biology and Fertility of Soils* 37: 184–189.
- Bernal MP, Albuquerque JA and Moral R (2009) Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource Technology* 100: 5444–5453.
- Bligh EG and Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37: 911–917.
- Castillo JM, Romero E and Nogales R (2013) Dynamics of microbial communities related to biochemical parameters during vermicomposting and maturation of agroindustrial lignocellulose wastes. *Bioresource Technology* 146: 345–354.
- Domínguez J and Gómez-Brandón M (2013) The influence of earthworms on nutrient dynamics during the process of vermicomposting. *Waste Management & Research* 31: 859–868.
- Edwards CA (2011) Introduction, history, and potential of vermicomposting technology. In: Edwards CA, Arancon N and Sherman RL (eds) *Vermiculture Technology*. Boca Raton: CRC Press, pp.1–10.
- Edwards CA and Burrows I (1988) Breakdown of animal, vegetable and industrial organic wastes by earthworms. In: Edwards CA and Neuhäuser EF (eds) *Earthworms in Wastes and Environmental Management*. The Hague, The Netherlands: SPB Academic Publishing, pp.211–219.

- Edwards CA and Niederer A (2011) The production of earthworm protein for animal feed from organic wastes. In: Edwards CA, Arancon N and Sherman RL (eds) *Vermiculture Technology*. Boca Raton: CRC Press, pp.323–334.
- EN 13037 (1999) Soils improvers and growing media – Determination of pH, CEN Brussels. 1999.
- EN 13651 (2001) Soil improvers and growing media – Extraction of calcium chloride/DTPA (CAT) soluble nutrients.
- Garg P, Gupta A and Satya S (2006) Vermicomposting of different types of waste using *Eisenia foetida*: A comparative study. *Bioresource Technology* 97: 391–395.
- Gómez-Brandón M, Lores M and Domínguez J (2013) Changes in chemical and microbiological properties of rabbit manure in a continuous-feeding vermicomposting system. *Bioresource Technology* 128: 310–316.
- Gunadi B, Blount C and Edward CA (2002) The growth and fecundity of *Eisenia fetida* (Savigny) in cattle solids pre-composted for different periods. *Pedobiologia* 46: 15–23.
- Gupta R and Garg VK (2009) Vermiremediation and nutrient recovery of non-recyclable paper waste employing *Eisenia fetida*. *Journal of Hazardous Materials* 162: 430–439.
- Hamid SNIN, Abdullah MF, Zakaria Z, et al. (2016) Formulation of fish feed with optimum protein-bound lysine for African catfish (*Clarias gariepinus*) fingerlings. *Procedia Engineering* 148: 361–369.
- Hanc A and Chadimova Z (2014) Nutrient recovery from apple pomace waste by vermicomposting technology. *Bioresource Technology* 168: 240–244.
- Hanc A, Ochevcova P and Vasak F (2017) Changes of parameters during composting of bio-waste collected over four seasons. *Environmental Technology* 38: 1751–1764.
- Hanc A and Pliva P (2012) Vermicomposting of garden biowaste and sewage sludge. *Waste forum* 2012: 103–110.
- Hanc A and Pliva P (2013) Vermicomposting biowaste. Certified methodology. Czech University of Life Sciences Prague, p.35. Available at: <http://www.vuzt.cz/svt/vuzt/novinky/metodika2013pliva.pdf> (accessed 5 January 2017).
- Hanc A, Novak P, Dvorak M, et al. (2011) Composition and parameters of household bio-waste in four seasons. *Waste Management* 31: 1450–1460.
- Hue NV and Liu J (1995) Predicting compost stability. *Compost Science & Utilization* 3: 8–15.
- Harada Y and Inoko A (1980) Relationship between cation-exchange capacity and degree of maturity of city refuse composts. *Soil Science and Plant Nutrition* 26: 353–362.
- Iglesias-Jimenez E and Perez-Garcia V (1992) Determination of maturity indices for city refuse composts. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 38: 331–343.
- Ko HJ, Kim KY, Kim HT, et al. (2008) Evaluation of maturity parameters and heavy metal contents in composts made from animal manure. *Waste Management* 28: 813–820.
- Li W, Wang C and Sun Z (2011) Vermipharmaceuticals and active proteins isolated from earthworms. *Pedobiologia* 54S: S49–S56.
- Mupondi LT, Mkeni PNS and Muchaonyerwa P (2011) Effects of pre-composting step on the vermicomposting of dairy manure-waste paper mixtures. *Waste Management & Research* 29: 219–228.
- Ndegwa PM and Thompson SA (2001) Integrating composting and vermicomposting in the treatment and bioconversion of biosolids. *Bioresource Technology* 76: 107–112.
- Němeček J, Pokorný P, Lhotský O, et al. (2016) Combined nano-biotechnology for in-situ remediation of mixed contamination of groundwater by hexavalent chromium and chlorinated solvents. *Science of the Total Environment* 563: 822–834.
- Oravec O, Elhottova D, Kristufek V, et al. (2004) Application of ARDRA and PLFA analysis in characterizing the bacterial communities of the food, gut and excrement of saprophagous larvae of *Penthetria holosericea* (Diptera: *Bibionidae*): A pilot study. *Folia Microbiologica* 49: 83–93.
- Pattnaik S and Reddy MV (2010) Nutrient status of vermicompost of urban green waste processed by three earthworm species – *Eisenia fetida*, *Eudrilus eugeniae*, and *Perionyx excavatus*. *Applied and Environmental Soil Science* 2010: 1–13.
- Pramanik P and Chung YR (2011) Changes in fungal population of fly ash and vinasse mixture during vermicomposting by *Eudrilus eugeniae* and *Eisenia fetida*: Documentation of cellulase isozymes in vermicompost. *Waste Management* 31: 1169–1175.
- Roig A, Lax A, Cegarra J, et al. (1988) Cation exchange capacity as a parameter for measuring the humification degree of manures. *Soil Science* 146: 311–316.
- Sen B, Hamelin J, Bru-Adan V, et al. (2008) Structural divergence of bacterial communities from functionally similar laboratory-scale vermicomposts assessed by PCR-CE-SSCP. *Journal of Applied Microbiology* 105: 2123–2132.
- Singh NB, Khare AK, Bhargava DS, et al. (2005) Effect of initial substrate pH on vermicomposting using *Perionyx excavatus* (Perrier, 1872). *Applied Ecology and Environmental Research* 4: 85–97.
- Singh MK and Singh P (2014) *Handbook on Vermicomposting: Requirements, Methods, Advantages and Applications*. Hamburg: Anchor Academic Publishing, p.144.
- Šnajdr J, Cajthaml T, Valaskova V, et al. (2011) Transformation of *Quercus petraea* litter: successive changes in litter chemistry are reflected in differential enzyme activity and changes the microbial community composition. *FEMS Microbiology Ecology* 75: 291–303.
- Taeporamaysamai O and Ratanatamskul C (2016) Co-composting of various organic substrates from municipal solid waste using an on-site prototype vermicomposting reactor. *International Biodeterioration & Biodegradation* 113: 357–366.
- Tarayre C, De Clercq L, Charlier R, et al. (2016) New perspectives for the design of sustainable bioprocesses for phosphorus recovery from waste. *Bioresource Technology* 206: 264–274.
- Thompson W, Legee P, Millner P, et al. (2003) *Test methods for the examination of composts and composting*. Bethesda, USA: The US Composting Council, US Government Printing Office.
- Tiunov AV and Scheu S (2004) Carbon availability controls the growth of detritivores (*Lumbricidae*) and their effect on nitrogen mineralization. *Oecologia* 138: 83–90.
- Váchalová R, Borová-Batt J, Kolář L, et al. (2014) Selectivity of ion exchange as a sign of soil quality. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 45: 2673–2679.
- Wu L, Ma LQ and Martinez GA (2000) Comparison of methods for evaluating stability and maturity of biosolids compost. *Journal of Environmental Quality* 29: 424–429.
- Zmora-Nahum S, Markovitch O, Tarchitzky J, et al. (2005) Dissolved organic carbon (DOC) as a parameter of compost maturity. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 2109–2116.

5.2. Hanč, A., Hřebečková, T., et al. (2019). Vermikompostování lihovarských výpalků v systému pásové hromady s vertikálním doplňováním

Název: Vermicomposting of distillery residues in a vertical-flow windrow system

Autoři: Aleš Hanč, Tereza Hřebečková, Stanislav Kužel

Publikováno v časopise: Waste and Biomass Valorization. 10, 3647-3657

Informace o časopise: IF= 2,358 (2018); Springer; ISSN: 1877-2641



Vermicomposting of Distillery Residues in a Vertical-Flow Windrow System

Ales Hanc¹ · Tereza Hrebeckova¹ · Stanislav Kuzel²

Received: 13 November 2018 / Accepted: 1 April 2019 / Published online: 5 April 2019
© Springer Nature B.V. 2019

Abstract

The present study evaluated the feasibility and processes occurring in a vertical-flow windrow vermicomposting system of distillery residues together with wheat straw. There were differences between the very top and lower layers. The top and so youngest layer showed the greatest humidity and electrical conductivity among the layers. It was characterized by partially decomposed organic matter with a great amount of earthworm biomass (2.5 g kg⁻¹), which was confirmed by parameters such as C_{tot} (34%), N_{tot} (2.25%), and C/N (15.3). On the other hand, the lower layers were characterized by greater maturity, which was documented by a lower content of microbial biomass and activity of hydrolytic enzymes, as well as a slightly alkaline pH (7.6–7.9), and lesser values for N–NH₄⁺ (22–84 mg kg⁻¹) and dissolved organic carbon (5228–6564 mg kg⁻¹), which was indirectly proportional to the ion-exchange capacity (57–60 mmol₊ 100 g⁻¹). Among the examined macronutrients, potassium showed the greatest content. The total contents of P and Mg increased directly with the age of the vermicomposted material, which was related to the loss of organic matter. The proportion of the available contents of P, K, and Mg constituted on average in all of the layers 11, 64, and 10%, respectively, of the total content. On the basis of the detected parameters, the top layer is suitable for a new windrow and for the preparation of aqueous extracts. The older layers are suitable for use as an organic fertilizer.

Keywords Distillery residues · Vermicomposting · Layers · Chemical and biological properties

Statement of Novelty

Improper handling of distillery residues can have negative impacts on the environment. The vermicomposting of distillery residues is one of the possible solutions for suitable handling of this biowaste. Treatment of distillery residues by earthworms has not yet been documented in the scientific literature. The importance of this research consists of the detailed characterization of individual layers in a vertical-flow windrow vermicomposting system operated in outdoor conditions. This system is the most widespread in a large-scale vermicomposting. On the basis of chemical and

biological parameters, the possibilities of subsequent uses for the layers are proposed. The results of this research are useful for producers of distillery residues, vermicomposting plants, and vermicompost users, especially growers.

Introduction

The increasing trend of environmental protection contributes to the growth of demand for alternative sources. The trend of recent years is the addition of bioethanol to fuels in order to reduce oil consumption. As a result, there is an increase in the number and capacity of distilleries. Alcohol production in distilleries consists of four main steps: feed preparation, fermentation, distillation, and packaging [1]. Ethanol can be prepared from various biomass materials but the potential for their use as feedstock depends on the cost, availability, carbohydrate contents, and the ease of fermentability to alcohol [2]. Biomass suitable for the production of bioethanol is divided into three groups: biomass containing simple sugars (e.g. fruit crops, sugar beet, and cane),

✉ Ales Hanc
hanc@af.czu.cz

¹ Department of Agro-Environmental Chemistry and Plant Nutrition, Czech University of Life Sciences Prague, Kamycka 129, 165 00 Prague 6, Czech Republic

² Department of Agroecosystems, University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Ceske Budejovice, Czech Republic

the biomass-containing starch (e.g. cereals and potatoes), and lignocellulosic biomass (e.g. straw, energy crops, and biowaste) [3]. Distillery residues are the main waste product of ethanol production [4]. In the production of 1 L of ethanol, 15 to 20 L of distillery residues are produced [5]. The production and the characteristics of the spent residues are greatly variable and dependent on the raw materials used and various aspects of the ethanol production process. Wash water used to clean the fermenters, cooling water blow down, and boiler water blow down further contribute to its variability [6].

The handling of distillery residues can cause environmental problems due to their seasonal production and polluting characteristics. Direct discharge of effluent into watercourses poses a serious threat to aquatic ecosystem. High chemical oxygen demand values and great nitrogen and phosphorus contents can lead to eutrophication of watercourses. At the same time, the coloration of fragments can reduce light transmission, which leads to inhibition of photosynthetic activity and depletion of dissolved oxygen in water [7]. Direct application of distillery residues can have a detrimental effect on the soil due to their inappropriate physicochemical properties, especially low pH [8]. It causes inhibition of seed germination. Greatly toxic effects of raw distillery effluent on the growth and germination of *Vigna radiata* seeds even at a lesser concentration of 5% (v/v) was reported. Leaching of protein and carbohydrates from the seeds as well as a decrease in the activities of important enzymes like alkaline phosphatase and ATPase were also observed [9]. Depletion of vegetation by reducing the soil alkalinity and the availability of some nutrients can be found, if discharged without adequate treatment [10]. Effective treatment can be achieved by using various biological, physical, and chemical treatment processes, either alone or in combination. Biological treatment of distillery spent wash is either aerobic or anaerobic, but in most cases a combination of both is used. A typical chemical oxygen demand (COD)/biochemical oxygen demand (BOD) ratio of 1.8–1.9 indicates the suitability of the effluent for biological treatment [11]. Various physicochemical methods such as adsorption, coagulation–flocculation, and oxidation processes like Fenton's oxidation, ozonation, electrochemical oxidation using various electrodes and electrolytes, nanofiltration, reverse osmosis, ultrasound, and different combinations of these methods have also been practiced for the treatment of distillery effluent. These processes are generally employed after the primary anaerobic treatment in order to further reduce the COD and color. A majority of these methods decolorize the effluent by either concentrating the color into the sludge or by breaking down the colored molecules [1, 12, 13].

The composting and vermicomposting of distillery residues are two of the possible solutions for handling this feedstock. Composting involves the accelerated degradation of

organic matter by microorganisms under controlled conditions, during which the organic material undergoes a characteristic thermophilic stage 45–65 °C that allows sanitization of the waste by the elimination of pathogenic microorganisms. Two phases can be distinguished in composting: (1) a thermophilic stage, where decomposition takes place more intensively and which therefore constitutes the active phase of composting, (2) a maturation stage, which is marked by decreases in the temperature to the mesophilic range and where the remaining organic compounds are degraded at a slower rate. The duration of the active phase depends on the characteristics of the waste (the amounts of easily biodegradable substances) and on the management of the controlling parameters (aeration and moisture). The extent of the maturation phase is also variable, and it is normally marked by the disappearance of phytotoxic compounds. Thermophilic composting is well established on the industrial scale for solid organic-waste treatment, although the loss of nitrogen through volatilization of NH₃ during the thermophilic stage of the process is one of the major drawbacks of the process. Through composting, the heterogeneous fresh organic material is transformed into a homogeneous and well-stabilized humus-like product [14].

Vermicomposting involves the bio-oxidation and stabilization of organic material by the joint action of earthworms and microorganisms. Although it is the microorganisms that biochemically degrade the organic matter, earthworms are the crucial drivers of the process, as they aerate, condition, and fragment the substrate, thereby drastically increasing the microbial activity. Earthworms act as mechanical blenders. By disintegration of the organic matter they modify its physical and chemical status. The C:N ratio is gradually reduced and the surface is increased, whereby the mass is better exposed to the effects of microorganisms. Two phases can also be distinguished here, (1) an active phase where the earthworms process the waste, modifying its physical state and microbial composition, and (2) a maturation-like phase marked by the displacement of the earthworms toward fresher layers of undigested waste, where the microorganisms take over in the decomposition of the waste. As in composting, the duration of the active phase is not fixed and will depend on the species and population density of the earthworms and their ability to ingest the waste [15].

The main difference between thermophilic composting and vermicomposting is that composting is an aerobic process that can reach temperatures of 60–70 °C, whereas vermicomposting systems are mesophilic and must be maintained at temperatures below 35 °C. Exposure of the earthworms to temperatures above this, even for relatively short time periods, will kill them, and, to avoid such overheating in vermicomposting systems, very careful management of the wastes is required. Epigeic earthworms are very active. They will consume organic wastes located in

a relatively narrow horizontal aerobic layer of 10–15 cm, that is, close to the surface of a bed or container, very rapidly. The critical key to successful vermicomposting lies in adding organic wastes to the surface in successive thin layers at frequent intervals, so that any thermophilic heating that may occur does not become excessive. If well managed, this low level of heating will maintain the activity of the earthworms at a high level of efficiency through colder periods in temperate countries, since vermicomposting works best at temperatures between 20–25 °C. Temperatures below 10 °C generally result in reduced or little feeding activity; and below 4 °C, cocoon production and development of young earthworms ceases. In extreme temperature conditions earthworms tend to hibernate and migrate to deeper layers of the windrow for protection. Earthworms can also acclimate to temperature in autumn and survive the winter, but they cannot survive extended periods under freezing conditions unless they are in protective cells. The unfavorable effect of elevated temperatures (above 30 °C) on most species of earthworms is not entirely a direct effect because these warm temperatures also promote chemical and microbial activities in the substrate. The increased microbial activity tends to consume the available oxygen, with negative effects on the survival of earthworms. There is a strong relationship between the moisture content of organic wastes and the growth rate of earthworms. *Eisenia andrei* can survive in moisture ranges between 50 and 90% C, but they grow more rapidly between 80 and 90% in organic wastes. Earthworms lack specialized respiratory organs, and oxygen and carbon dioxide diffuse through their body wall. Thus, earthworms are very sensitive to anaerobic conditions. *Eisenia andrei* have been reported to migrate in large numbers from a water-saturated substrate in which oxygen has been depleted, or in which carbon dioxide or hydrogen sulfide has accumulated. The earthworms are sensitive to ammonia and salts. They will die quickly if exposed to wastes containing more than 0.5 mg of ammonia per g⁻¹ of waste and more than 0.5% salts [16]. Vermicomposting employing earthworms is increasingly gaining attention as a sustainable and ecofriendly technique to transform and sanitize a variety of organic wastes into nutrient-rich biofertilizer [17, 18]. Compared to the feedstock and conventional compost, vermicompost contains increased and

more soluble levels of major nutrients and organic matter with improved quality. [19].

At this time, there do not appear to be any scientific studies on the vermicomposting of distillery residues. The aim of the study was to evaluate the feasibility of vermicomposting of distillery residues under outdoor conditions. The study sought to contribute to the understanding of the processes occurring in a vertical-flow windrow vermicomposting system.

Materials and Methods

Feedstocks

The composition of the distillery residues corresponded to the just processed fruit in a grower distillery. The type of fruit was based on the growing season. The distillery processed mostly apples, pears, plums, and cherries. Distillery residues were stored in an underground tank, so a mixture with 5.7% total solids was therefore applied. The pH value ranged in the acidic area (on average 4.9) and the electrical conductivity reached 480 $\mu\text{S cm}^{-1}$. For the experiment, dry wheat straw from compacted bales with 90% dry matter content was used. Selected physicochemical parameters of the feedstocks are shown in Table 1.

Description of Experiment

The experiment was set up under operating conditions at a family grower distillery in Cesov, Czech Republic (N50°20.33638', E15°21.89653'). The vermicompost pile occupied a ground space 6 × 8 m². The bedding layer consisted of precomposted beef manure and grape marc with earthworms (*Eisenia andrei*), with a density of about 50 earthworms per liter, and was placed first on a flat surface. Wheat straw layers were added every 6 months. Distillery residues were applied on these layers every 2 weeks. Due to the influence of precipitation, the application of distillery residues, and the transformation of organic matter, the layers settled. After 2 years from the beginning of the experiment, samples were taken up from cross profiles. Sampling of each layer was carried out in four replications. The depth placement above the bedding layer and the age of each layer were as follows:

Table 1 Selected physicochemical parameters of the feedstocks used (pH and EC were determined in wet matter; other parameters in dry matter)

	Dry matter (%)	pH/H ₂ O	EC (mS/cm)	C _{tot} (%)	N _{tot} (%)	C/N	P _{tot} (%)	K _{tot} (%)	Ca _{tot} (%)	Mg _{tot} (%)
Distillery residues	5.7	4.9	0.48	45	2.2	20	0.25	1.61	0.75	0.17
Straw	90	7.4	1.5	46	0.6	77	0.02	0.47	0.28	0.03

- IV: 0–30 cm, 0–6 months
- III: 31–60 cm, 6–12 months
- II: 61–90 cm, 12–18 months
- I: 91–120 cm, 18–24 months

Potential earthworms were separated, counted, weighted, and lyophilized. The resulting vermicompost sample without earthworms was divided into three parts and treated as required for laboratory analyses. One part of the vermicompost sample was stored at 4 °C until the pH and electrical conductivity (EC) could be determined. The second part was dried at 30 °C to a constant weight and ground. This was then used for analyses of the total and available contents of elements and the ion exchange capacity (IEC). The third part of the vermicompost sample was frozen at –20 °C and then lyophilized for subsequent determination of the groups of microorganisms by the PLFA method and for enzyme activity.

Chemical and Biological Analyses

Measurements of active pH and EC were conducted on samples mixed with deionized water (1:5 w/v wet basis) using a WTW pH 340 i and Testo 240, respectively according to EN 13037 [20]. Total carbon (C_{tot}) and nitrogen (N_{tot}) were determined using the CHNS Vario MACRO cube analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH, Germany). In this instrument, about 25 mg of the sample was burned in a catalytic furnace, and subsequently C_{tot} and N_{tot} were determined by using a thermal conductivity detector. The total contents of P, K, and Mg were determined by decomposition utilizing a wet method in a closed system with microwave heating using an Ethos 1 microwave system (MLS GmbH, Germany). The contents of ammonium nitrogen ($N\text{-NH}_4^+$), dissolved organic carbon (DOC), and the available portions of P, K, and Mg were determined in calcium chloride/DTPA (CAT) solution (0.01 mol l⁻¹ CaCl₂ and 0.002 mol l⁻¹ diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA)) at a ratio of 1:10 (w/v) according to the International BSI Standard EN 13651 [21]. The $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ contents in the extracts were measured colorimetrically using a SKALAR SANPLUS SYSTEM[®]. The element concentrations were determined using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES, VARIAN VistaPro, Varian, Australia) with axial plasma configuration. The ion-exchange capacity (IEC) was determined conductometrically as described by Váchalová et al. [22]. Samples for the phospholipid fatty acid (PLFA) analysis were extracted in triplicate using a mixture of chloroform, methanol, and phosphate buffer (1:2:0.8; v/v/v) according to Bligh and Dyer [23]. The extracts were analyzed by tandem gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS; 450-GC, 240-MS Varian, Walnut Creek, CA, USA). Methylated fatty acids were identified according to

their mass spectra using a mixture of chemical standards obtained from Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic and Matreya LLC, USA. Bacteria were determined on the basis of 17:0, 16:1 ω 9, 15:0 and 16:1 ω 7. Biomass Gram positive (G+) bacteria were quantified as the sum of i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, and a17:0. The Gram negative (G–) bacteria were determined on the basis of 16:1ω7, 18:1ω7, cy17:0, cy19:0, 16:1ω5, 10Me-17:0, 10Me-18:0, 10Me-16:0 were used for actinobacteria and 18:2ω6,9 for fungi. The total biomass was quantified as the sum of all of the markers together with 16:0 and 18:1ω9 [24]. The labeling is typical for this research field [25]. The activities of the hydrolytic enzymes such as β-D-glucosidase, phosphatase, sulfatase, lipase, chitinase, cellobiohydrolase, alanine aminopeptidase, and leucine aminopeptidase were quantified by fluorescence detection according to Baldrian [26] and Štursová and Baldrian [27]. Briefly, the prepared suspension (0.2 g of lyophilized sample and 20 mL of 50 mmol L⁻¹ acetate buffer with pH 5) was homogenized by the Ultra-Turrax instrument. Then, it was pipetted into the appropriate well in microtiter plates and the addition of the relevant substrate followed. The microtiter plates were placed in an incubator heated to 40 °C for 5 min. Subsequently, the fluorescence of the substrate was measured using the Tecan Infinite[®] M200 instrument. For urease activity determination, the method according to Kandeler and Gerber [28] was applied. It is based on ammonia determination after incubation of samples with urea. Determination of nitrate reductase activity was carried out according to Kandeler [29], and it is based on nitrite determination after incubation of vermicompost with nitrate. The effect of nitrite reductase is inhibited by the addition of 2,4-dinitrophenol.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the STATISTICA 13.2 software (StatSoft, Tulsa, Oklahoma USA). A one-way ANOVA using a 95% confidence level followed by Tukey's test was performed. Spearman's correlations were explored between the agrochemical and biological parameters at the 0.05 probability levels.

Results and Discussion

Physicochemical Parameters

The basic physicochemical parameters are shown in Table 2.

The dry matter increased with the age of the layers. The least dry matter content was found in the top layer. It was caused by the high humidity of the applied distillery residues (94.3%) and by exposure of the surface of the pile to weather conditions. The dry matter in the other layers was on average

Table 2 Basic physicochemical parameters of the layers in the large-scale vertical-flow windrow vermicomposting system

Layer	Dry matter (%)	pH/H ₂ O	EC (μS cm ⁻¹)	C _{tot} (%)	N _{tot} (%)	C/N
IV	15.3 ± 2.42 ^a	7.41 ± 0.07 ^a	1162 ± 644 ^a	34.01 ± 5.45 ^a	2.25 ± 0.35 ^a	15.30 ± 2.80 ^b
III	25.8 ± 1.52 ^b	7.72 ± 0.04 ^b	976 ± 39 ^a	29.93 ± 1.35 ^a	2.37 ± 0.09 ^a	12.64 ± 0.76 ^a
II	25.9 ± 1.38 ^b	7.64 ± 0.10 ^b	683 ± 51 ^a	31.94 ± 3.08 ^a	2.73 ± 0.25 ^a	11.72 ± 0.55 ^a
I	28.3 ± 0.65 ^b	7.92 ± 0.09 ^c	760 ± 23 ^a	28.45 ± 2.42 ^a	2.62 ± 0.17 ^a	10.85 ± 0.24 ^a

Values are the mean ± SD (n=4). Different letters in a column indicate significant differences (Tukey's HSD test, P ≤ 0.05)

IV: 0–30 cm, 0–6 months; III: 31–60 cm, 6–12 months; II: 61–90 cm, 12–18 months; I: 91–120 cm, 18–24 months

1.75 times greater, with differences between the layers not statistically significant. The pH values in the vermicomposting pile ranged from 7.45 to 7.92. The greatest value was measured at the oldest layer. An increase in the pH value was observed in the direction from the youngest layer to the oldest. This can be caused by the fact that the microorganisms and earthworms which were present degraded the organic acids and partially consumed them. These values also indicate that the earthworms were able to increase the pH of the substrate from acidic values (the pH of distillery residues was 4.9) to neutral or slightly alkaline values by the gradual transformation of the organic matter. This corresponds to Singh et al. [30], who vermicomposted mixed plant residues with an initial pH of 4.3–6.9. They found a neutral pH in all treatments after 30 days of vermicomposting. The EC values in the layers did not differ significantly, nevertheless they showed a decreasing trend. A possible explanation may be the gradual leaching of salts from the layers. The total carbon content showed the greatest values in the youngest layer and showed a decrease to the least value in the oldest layer. This is due to the gradual loss of volatile solids in the form of CO₂. The content of C_{tot} in the youngest upper level IV was 34% that is lower by 11% and 12% compared the used feedstocks (distillery residues and straw, respectively). A further decrease was found between the top layer IV and III (from 34 to 29.9%). In layers III, II and I, content of C_{tot} have stabilized. A slight increase between layers III and II was within the standard deviation. Similar values in layers III, II and I can be explained by the following factors and conditions: (1) The highest decomposition of organic matter was in the presence of earthworms (IV and III layers), (2) The bottom layers were almost free of earthworms, (3) Low microbial and enzymatic activity was found in the bottom layers where material became more stable and mature which proves low content of N–NH₄⁺ and DOC in the bottom layers I and II and on the other hand the highest parameter of IEC/C_{tot} (Table 3), (4) Apparently as a result of settlement of the material, anaerobic or anoxic conditions were occurred in these layers, so the decomposition and release of carbon in the form of CO₂ was minimal, (5) There was almost no decomposition of organic matter

Table 3 Effect of depth and age of the profile on the selected maturity indicators

Layer	N–NH ₄ ⁺ (mg kg ⁻¹)	DOC (mg kg ⁻¹)	IEC (mmol ₊ 100 g ⁻¹)	IEC/C _{tot}
IV	162.05 ± 54.45 ^c	8799 ± 983 ^c	55.0 ± 3.27 ^a	1.64 ± 0.23 ^a
III	83.66 ± 21.62 ^b	6564 ± 379 ^b	60.2 ± 2.87 ^a	2.01 ± 0.10 ^b
II	21.27 ± 4.23 ^a	5347 ± 183 ^a	71.2 ± 7.37 ^b	2.23 ± 0.09 ^b
I	22.30 ± 1.92 ^{ab}	5228 ± 320 ^a	57.2 ± 3.20 ^a	2.02 ± 0.19 ^b

Values are the mean ± SD (n=4). Different letters in a column indicate significant differences (Tukey's HSD test, P ≤ 0.05)

IV: 0–30 cm, 0–6 months; III: 31–60 cm, 6–12 months; II: 61–90 cm, 12–18 months; I: 91–120 cm, 18–24 months

in the old layers but synthesis of humic substances. High content of C_{tot} in old layers was probably caused by high content of C_{tot} in used feedstocks (distillery residues 45% C_{tot} and straw 46% C_{tot}). In some vermicomposts, high C_{tot} values may occur as it is documented in the following studies. Final vermicompost coming from grape marc contained 37% C_{tot} [31]. Total organic carbon in vermicomposts from cow dung, poultry droppings and food industry sludge in different proportions after 13 weeks of intensive laboratory vermicomposting ranged from 30 to 38% [32]. Nine different vermicomposts based on spent mushrooms waste, cow dung, vegetables residue, coconut husk and leaf litter contained 22–27% C_{tot} [33]. The amount of total nitrogen gradually increased with the age of the layers. However, the measured values did not show a statistically significant difference. Talashilkar et al. [34] attributes an increase in N_{tot} to the gradual addition of nitrogen by earthworms in the form of slime containing nitrogenous substances. The relatively low C/N value in the top layer indicates a rapid transformation of organic matter through the earthworms. The decrease in the C/N value with the age of the vermicomposted material (from 15.3 to 10.9) is consistent with the observation by Hanc et al. [35], who found a similar decrease in C/N (from 16.1 to 10.4) in a vertical-flow windrow vermicomposting system of household biowaste. Torres-Climent et al. [36] who co-composted winery-distillery wastes with animal

manure, observed a decrease in the C/N from 21.9 to 13.5. Among the examined macroelements, potassium showed the greatest content (Fig. 1).

The total contents of P and Mg increased directly with the age of the vermicomposted material, which was related to the loss of organic matter. The average contents of P_{tot} and Mg_{tot} increased in the bottom layer 2.16-fold and 1.98-fold, respectively, compared to the top layer. The behavior of K_{tot} was different because the bottom layer contained 10% less K_{tot} than the top layer. In the case of available contents, an increase was found in the content of Mg_{avail} (1.83-fold) and a decrease in the contents of P_{avail} (0.72-fold) and K_{avail} (0.54-fold). The proportion of the available contents of P, K, and Mg constituted on average in all of the layers 11, 64, and 10%, respectively, of the total content. These proportions found during the vermicomposting of distillery residues with straw were less than for grape marc vermicomposting ($P=20\text{--}42\%$, $K=65\text{--}79\%$, and $Mg=11\text{--}13\%$) as reported by Castkova and Hanc [37].

Parameters of Maturity

In this experiment, the maturity of vermicompost was evaluated by parameters such as $N\text{-NH}_4^+$, DOC, IEC, and IEC/C_{tot} (Table 3).

A typical feature of immature vermicompost is the elevated content in $N\text{-NH}_4^+$ and DOC, and conversely lower values for IEC and IEC/C_{tot} . This phenomenon was confirmed by values in the youngest layer IV, which was subject to the intense process of vermicomposting. With the exception of the IEC parameter, layer IV differed statistically from the other layers. A great content of $N\text{-NH}_4^+$ in organic fertilizer can have detrimental effects on the germination and root development of plants. Thompson et al. [38] set

a limit value of $N\text{-NH}_4^+$ for mature compost of less than 75 mg kg^{-1} , which was met by the oldest layers I and II. DOC as the most active fraction of carbon decreased with the age of the layers. The proportion of DOC in the C_{tot} fluctuated between 1.7 to 2.6%. These two parameters positively correlated with each other ($R=0.55$, $p<0.05$). The greatest value of DOC was found in the youngest layer IV (0.88%). The differences among layers IV, III, and II were significant. On the other hand, differences between the older layers II and I were non-significant, which indicates completion of the transformation processes. In these layers, $5.3\text{ g of DOC kg}^{-1}$ was found, which is close to 4 g kg^{-1} and below the 10 g kg^{-1} recommended by Zmora-Nahum et al. [39] and Hue and Liu [40] as a limit for mature compost. Mineralization and humification may result in a change in ion-exchange properties, which can be quantified by a parameter known as IEC. The IEC had an increasing trend from layer IV ($55\text{ mmol}_+/100\text{ g}^{-1}$) to layer II ($71\text{ mmol}_+/100\text{ g}^{-1}$). This layer was the only one statistically different from the other layers. The IEC in layer I was $57\text{ mmol}_+/100\text{ g}^{-1}$, which could be explained by some transfer of a bedding layer consisting of precomposted beef manure and grape marc by earthworms to layer I at the beginning of the experiment. Taking into account the mineralization of organic matter the IEC/C_{tot} showed a significant difference between the youngest layer IV (1.6) and layer III (2.0). Hanc et al. [35] found that the IEC and IEC/C_{tot} during the vermicomposting of household biowaste were in the range of $52\text{--}60\text{ mmol}_+/100\text{ g}^{-1}$ and 2.4–3.5, respectively.

Earthworms

As is evident from Table 4, the greatest number of earthworms was found in the youngest layer (5.9 pcs/kg), and the

Fig. 1 Changes in the total and available P, K, and Mg (mg kg^{-1}) in layers I–IV of the large-scale vertical-flow windrow vermicomposting system. The values are the mean \pm SD ($n=4$). Different letters above the bars within the same element denote significant differences (Tukey's HSD test, $p<0.05$)

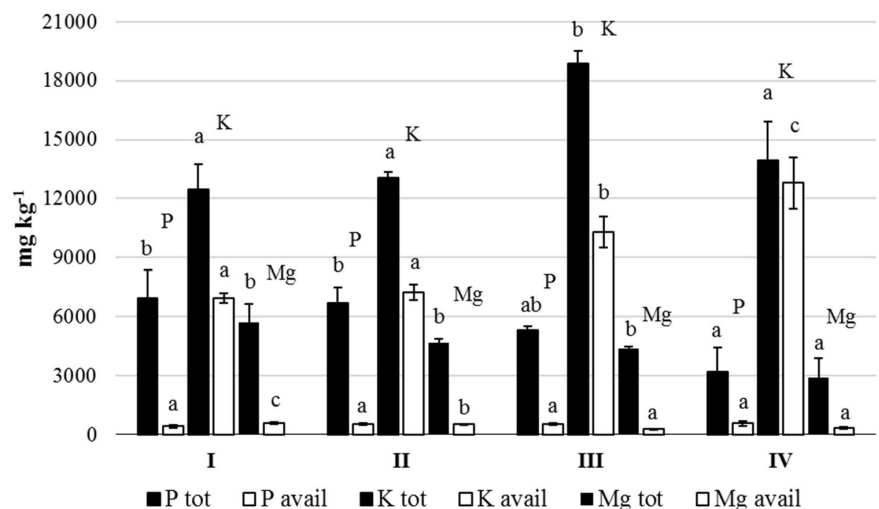


Table 4 Quantitative (number and biomass) and nutrient parameters of the earthworms in the windrow layers

Layer	Number (in 1 kg)	E. biomass (g kg ⁻¹)	P _{tot} (mg kg ⁻¹)	K _{tot} (mg kg ⁻¹)	Mg _{tot} (mg kg ⁻¹)
IV	5.9 ± 1.9 ^a	2.5 ± 0.8 ^b	5776 ± 855 ^a	3201 ± 777 ^a	696 ± 156 ^a
III	5.8 ± 2.2 ^a	2.6 ± 1.0 ^b	6904 ± 1062 ^a	6434 ± 1183 ^a	1447 ± 264 ^a
II	1.6 ± 1.7 ^b	0.5 ± 0.7 ^a	9036 ± 1517 ^b	7929 ± 2603 ^b	2186 ± 893 ^b
I	1.4 ± 0.6 ^c	0.4 ± 0.2 ^a	7226 ± 481 ^a	5548 ± 398 ^a	1514 ± 98 ^a

Values are the mean ± SD (n=4). Different letters in a column indicate significant differences (Tukey's HSD test, P ≤ 0.05)

IV: 0–30 cm, 0–6 months; III: 31–60 cm, 6–12 months; II: 61–90 cm, 12–18 months; I: 91–120 cm, 18–24 months

lowest number (1.4 pcs/kg) was in the bottom layer, because this layer was already decomposed.

The statistically non-significant differences were found between layers III (5.8 pcs/kg) and IV (5.9 pcs/kg). The greatest biomass of earthworms was in the two top layers. The average weight of one earthworm ranged from 0.29 to 0.45 g.

The earthworms are able to accumulate nutrients from the substrate. They also contain nutrients in their urine and mucus [41]. The total contents of nutrients in earthworms is shown in Table 4. The greatest total contents of phosphorus (9036 mg/kg), potassium (7929 mg/kg), and magnesium (2186 mg/kg) were measured in layer II, which exhibited a lower earthworm density, and which also showed statistically significant differences to the other layers. The least contents of these nutrients were found in layer IV, which was also the youngest layer. It can be stated that with the age of the layers, the contents of the observed elements in the earthworms increased. According to the Pearson's correlation coefficient, a positive correlation was found between the total Mg content in the vermicompost and in the earthworms. This coefficient increased from layer I (R = 0.47, p < 0.05) to layer IV (R = 0.97, p < 0.05), where the greatest number of earthworms was counted. For P content, a correlation coefficient was greater than R = 0.5, p < 0.05 for layer I, II, and IV. Only for layer III was the Pearson's correlation coefficient negative. In the case of K content, a negative correlation was found for all the layers except layer II, where the correlation was slightly positive (R = 0.28, p < 0.05). However, movement of earthworms through the profile, leakage, and the loss of organic matter must be taken into account.

Microorganisms

The total microbial biomass was very great during the whole process as it is illustrated in Fig. 2. The microbial biomass decreased from 196 to 97 µg g⁻¹ dw, directly proportional with the age of the layers. This is in accordance with the study by Aria et al. [42], who found that the earthworms significantly increased microbial activity in younger modules. The content of microorganisms was proportional to the

presence of earthworms, which confirms that vermicomposting is the interaction of these two groups of organisms [43]. The oldest three layers showed significantly greater contents of bacteria than fungi. In layer IV, a greater content of bacteria than fungi was found, but this result was not significantly different, because this layer exhibited a great standard deviation caused by the heterogeneity of the material.

Gómez-Brandón et al. [44] vermicomposted rabbit manure for 250 days using the earthworms *Eisenia fetida*. They found the greatest total microbial activity and the greatest bacterial activity after 100 days of vermicomposting. The greatest value for fungal activity was measured in their first uptake after 50 days of vermicomposting. In the current study, the greatest bacterial/fungal ratio was found in the oldest layer I (32.5), whereas the greatest content of both microorganisms (bacterial PLFAs 119.7 µg g⁻¹ dw; fungal PLFAs 25.4 µg g⁻¹ dw) and the smallest ratio was observed in the youngest layer IV (4.7). The dominant microorganisms were bacteria, especially G- bacteria, then G+ bacteria, followed by fungi and finally actinobacteria, which was almost suppressed. These findings correspond with the vermicomposting of grape marc done by Castkova and Hanc [37], but in their type of vermicompost the activities were lower. Also Fernández-Gómez et al. [45] found the same order the activity of microorganisms as we did: bacteria (43 nmol PLFA g⁻¹), G- bacteria (19 nmol PLFA g⁻¹), G+ bacteria (18 nmol PLFA g⁻¹), fungi (8 nmol PLFA g⁻¹), and actinomycetes (4 nmol PLFA g⁻¹) after 24 weeks of vermicomposting plant waste mixed with paper-mill sludge (2:1) using *E. fetida*. In the current experiment, for most microorganisms the activity decreased during the process. Only in the case of actinobacteria was a decreasing trend with the age of the layers not observed. In this case, the greatest activity was in layer III (4.4 µg g⁻¹ dw) and the least activity was in the youngest layer (2.6 µg g⁻¹ dw).

Enzyme Activity

The activity of ten enzymes is illustrated in Fig. 3a–d.

Units are µmol of specific substrate g⁻¹ h⁻¹. Substrates for arylsulphatase: 2.50 mmol L⁻¹ 4-methylumbelliferyl

Fig. 2 Changes in fungal PLFAs, bacterial PLFAs, and total microbial PLFAs biomass in the layers of the vertical-flow windrow vermicomposting of distillery residues. Values are the mean \pm SD (n=4)

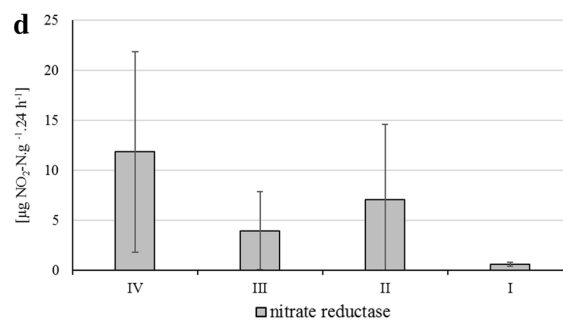
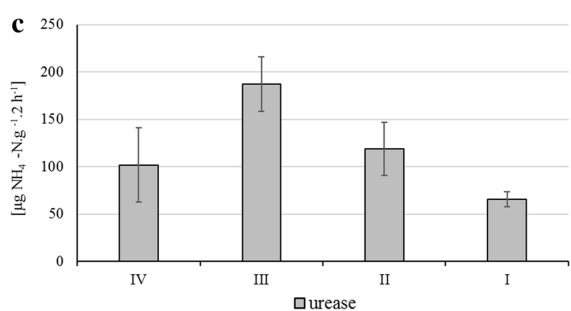
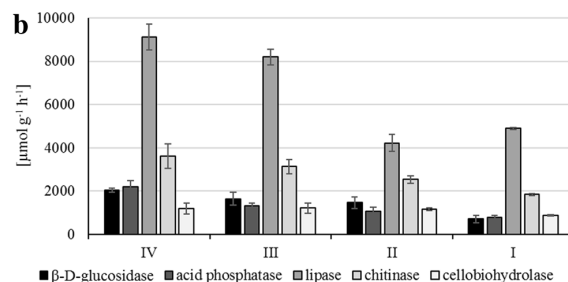
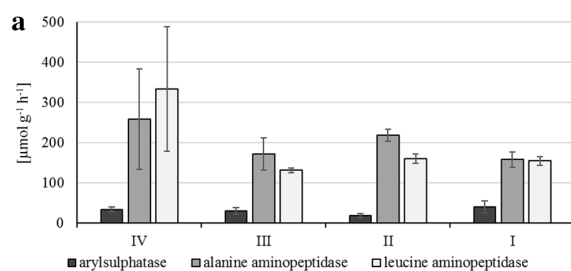
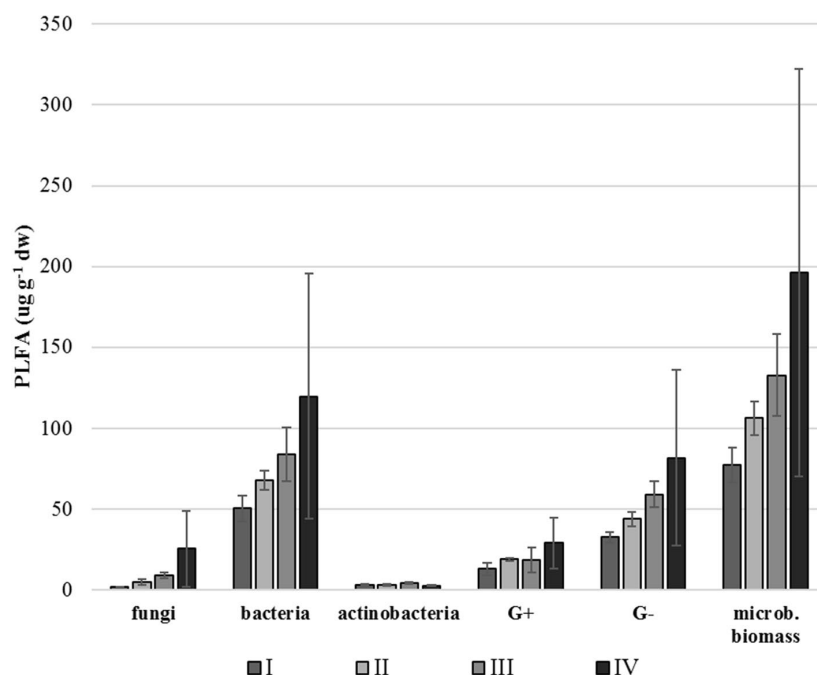


Fig. 3 Enzymatic activity of arylsulphatase, alanine aminopeptidase, leucine aminopeptidase (a), β-D-glucosidase, acid phosphatase, lipase, chitinase, cellobiohydrolase (b), urease (c), and nitrate reductase (d) in all layers during vermicomposting. The values are the mean \pm SD (n=4)

sulphate potassium salt (MUFS); alanine aminopeptidase: 2.50 mmol L⁻¹ L-alanine-7-amido-4-methylcoumarin (AMCA); leucine aminopeptidase: 2.50 mmol L⁻¹ leucine-7-amido-4-methylcoumarin (AMCL).

Units are μmol of specific substrate g⁻¹ h⁻¹. Substrates for β-D-glucosidase: 2.75 mmol L⁻¹ 4-methylumbelliferyl-β-D-glucopyranoside (MUG); acid phosphatase: 2.75 mmol L⁻¹ 4-methylumbelliferyl-phosphate (MUFPP);

lipase: 2.50 mmol L⁻¹ 4-methylumbelliferyl-caprylate (MUFY); chitinase: 1.0 mmol L⁻¹ 4-methylumbelliferyl-*N*-acetylglucosaminide (MUFN); cellobiohydrolase: 2.50 mmol L⁻¹ 4-methylumbelliferyl-*N*-cellobiopyranoside (MUFC).

For arylsulphatase, it cannot be conclusively shown that there were statistically significant changes because this activity was very low. It ranged from 39.3 μmol MUFS g⁻¹ h⁻¹ to 18.0 μmol MUFS g⁻¹ h⁻¹. The alanine and leucine aminopeptidase showed the greatest activity in the upper layer (IV). The very high standard deviation was probably caused by clusters of earthworms and heterogeneity of vermicomposted material in the youngest layer. The least activity was measured in layer I (157.7 μmol AMCA g⁻¹ h⁻¹) for the alanine aminopeptidase and in the layer III (131.2 μmol AMCL g⁻¹ h⁻¹) for the leucine aminopeptidase. The greatest β-D glucosidase (2053.3 μmol MUFG g⁻¹ h⁻¹), acid phosphatase (2197.6 μmol MUFP g⁻¹ h⁻¹), lipase (9117.6 μmol MUFY g⁻¹ h⁻¹), and chitinase (3613.7 μmol MUFN g⁻¹ h⁻¹) activities were measured in the youngest layer (Fig. 3b). This layer was very biologically active, with the greatest number of earthworms. On the other hand, the least activity of these enzymes except lipase was measured in the oldest layer, which was fully matured and stabilized. The greatest activity for β-D-glucosidase was measured by Fernández-Gómez et al. [46] in vermicompost from cow dung and in vermicompost from tomato-fruit waste after 12 weeks of vermicomposting. They also measured phosphatase, and its activity was multiple times greater in both vermicomposts than in our vermicompost. Nogales et al. [47] also measured these two enzymes during a laboratory study conducted with vermicomposting of grape marc for 16 weeks. The activity of these enzymes was greater than ours, but these activities decreased with the age of the vermicompost, which was the same as in our experiment. The greatest activity of cellobiohydrolase was measured in layer III (1219.2 μmol MUFC g⁻¹ h⁻¹) and the least activity was in the bottom layer (885.8 μmol MUFC g⁻¹ h⁻¹). Overall, the values of the middle layers were very close due to the heterogeneity of the material. In the case of urease (Fig. 3c), there was the same trend as for cellobiohydrolase. The greatest activity of urease was measured in layer III (187.1 μg NH₄-N g⁻¹ 2 h⁻¹) and the least activity was in layer I (65.7 μg NH₄-N g⁻¹ 2 h⁻¹). A greater urease activity (104 μg NH₄-N g⁻¹ h⁻¹) was found by Romero et al. [48], who used vermicompost from grape marc to enrich the soil. Almost the same value (about 102 μg NH₄-N g⁻¹ h⁻¹) was measured by Pramanik et al. [49] in their control variant of vermicompost based on cow dung after 70–85 days of vermicomposting using *E. fetida* in the process of single feeding. The activity of nitrate reductase was very low throughout the process (Fig. 3d). The greatest activity was found in the youngest layer (11.8 μg NO₂-N g⁻¹ 24 h⁻¹). The lowest

value for the nitrate reductase activity was in the oldest layer (0.6 μg NO₂-N g⁻¹ 24 h⁻¹). All the layers showed no significant differences in the activity of this enzyme, because there were great standard deviations.

Conclusion

The top and so youngest layer was characterized by partially decomposed organic matter with a great amount of earthworm biomass, which was confirmed by parameters such as humidity, C_{tot}, N_{tot}, and C/N. On the other hand, the lower layers were characterized by greater maturity which was documented by lesser contents of microbial biomass and activity of hydrolytic enzymes as well as a slightly alkaline pH, and lesser values for N-NH₄⁺ and dissolved organic carbon, which was indirectly proportional to the ion-exchange capacity. Of the total and available nutrients studied, potassium was the greatest, followed by phosphorus and magnesium. On the basis of the detected parameters, the top layer is suitable for a new windrow and for the preparation of aqueous extracts. The older layers are suitable for use as an organic fertilizer. The results obtained could encourage companies to effectively use this valuable biowaste that is currently, unfortunately, often unnecessarily removed.

Acknowledgements The authors would like to thank Iva Labastova from family grower distillery in Cesov for experiment maintenance and Christina Baker Starrman for revision of the English text.

Funding The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic under NAZV Project No. QJ1530034 and by the Ministry of Education, Youth and Sports under FAFNR S-Grant.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

References

1. Satyawali, Y., Balakrishnan, M.: Wastewater treatment in molasses based alcohol distilleries for COD and color removal: a review. *J. Environ. Manag.* **86**, 481–497 (2008)
2. Ogbonna, J.C.: Fuel ethanol production from renewable biomass resources. In: Pandey, A. (ed.) *Concise Encyclopedia of Biore-source Technology*, pp. 346–361. Food Products Press, New York (2004)
3. Muktham, R., Bhargava, S.K., Bankupalli, S., Ball, A.S.: A review on 1st and 2nd generation bioethanol production—recent progress. *J. Sustain. Bioenergy Syst.* **6**, 72–92 (2016)

4. Wilkie, A.C., Riedesel, K.J., Owens, J.M.: Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass Bioenergy* **19**, 63–102 (2000)
5. van Haandel, A.C., Catunda, P.F.C.: Profitability increase of alcohol distilleries by the rational use of byproducts. *Water Sci. Technol.* **29**, 117–124 (1994)
6. Pant, D., Adholeya, A.: Biological approaches for treatment of distillery wastewater: a review. *Biores. Technol.* **98**, 2321–2334 (2007)
7. Mohana, S., Acharya, B.K., Madamwar, D.: Distillery spent wash: treatment technologies and potential applications. *J. Hazard. Mater.* **163**, 12–25 (2009)
8. Bustamante, M.A., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinoza, A., Moreno-Caselles, J., Pérez-Murcia, M.D.: Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Manage.* **28**, 372–380 (2008)
9. Kannan, A., Upreti, R.K.: Influence of distillery effluent on germination and growth of mung bean (*Vigna radiata*) seeds. *J. Hazard. Mater.* **153**, 609–615 (2008)
10. Choudhary, P., Raj, A., Bharagava, R.N.: Environmental pollution and health hazards from distillery wastewater and treatment approaches to combat the environmental threats: a review. *Chemosphere* **194**, 229–246 (2018)
11. Singh, P.N., Robinson, T., Singh, D.: Treatment of industrial effluents—distillery effluent. In: Pandey, A. (ed.) *Concise Encyclopedia of Bioresource Technology*, pp. 135–141. Food Products Press, New York (2004)
12. Wagh, M.P., Nemade, P.D.: Treatment of distillery spent wash by using chemical coagulation (CC) and electro-coagulation (EC). *Am. J. Environ. Protection.* **3**, 159–163 (2015)
13. Prajapati, A.K., Chaudhari, P.K.: Physicochemical treatment of distillery wastewater—a review. *Chem. Eng. Commun.* **202**, 1098–1117 (2015)
14. Epstein, E.: *The Science of Composting*. CRC Press LLC, Boca Raton (1997)
15. Dominguez, J., Edwards, C.A.: Relationship between composting and vermicomposting. In: Edwards, C.A., Arancon, N.Q., Sherman, R. (eds.) *Vermiculture Technology*, pp. 11–25. CRC Press, Boca Raton (2011)
16. Edwards, C.A.: Low technology vermicomposting systems. In: Edwards, C.A., Arancon, N.Q., Sherman, R. (eds.) *Vermiculture Technology*, pp. 11–25. CRC Press, Boca Raton (2011)
17. Lim, S.L., Lee, L.H., Wu, T.Y.: Sustainability of using composting and vermicomposting technologies for organic solid waste biotransformation: recent overview, greenhouse gases emissions and economic analysis. *J. Clean. Prod.* **111**, 262–278 (2016)
18. Swati, A., Hait, S.: A comprehensive review of the fate of pathogens during vermicomposting of organic wastes. *J. Environ. Qual.* **12**, 16–29 (2018)
19. Sinha, R.K., Agarwal, S., Chauhan, K., Valani, D.: The wonders of earthworms and its vermicompost in farm production: Charles Darwin's 'friends of farmers', with potential to replace destructive chemical fertilizers from agriculture. *Agric. Sci.* **1**, 76–94 (2010)
20. EN 13037.: *Soils improvers and growing media—Determination of pH*, CEN Brussels (1999)
21. EN 13651.: *Soil improvers and growing media—extraction of calcium chloride/DTPA (CAT) soluble nutrients* (2001)
22. Váchalová, R., Borová-Batt, J., Kolář, L., Váchal, J.: Selectivity of ion exchange as a sign of soil quality. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **45**, 2673–2679 (2014)
23. Bligh, E.G., Dyer, W.J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys.* **37**, 911–917 (1959)
24. Šnajdr, J., Cajthaml, T., Valášková, V., Merhautová, V., Petráňková, M., Spetz, P., Leppänen, K., Baldrian, P.: Transformation of *Quercus petraea* litter: successive changes in litter chemistry are reflected in differential enzyme activity and changes the microbial community composition. *FEMS Microbiol. Ecol.* **75**, 291–303 (2011)
25. Oravec, O., Elhottová, D., Křišťůfek, V., Šustr, V., Frouz, J., Trříska, J., Máriaľigetı, K.: Application of ARDRA and PLFA analysis in characterizing the bacterial communities of the food, gut and excrement of saprophagous larvae of *Penthetria holosericea* (Diptera: *bibionidae*): a pilot study. *Folia Microbiol.* **49**, 83–93 (2004)
26. Baldrian, P.: Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. *Plant Soil Environ.* **55**, 370–378 (2009)
27. Štursová, M., Baldrian, P.: Effects of soil properties and management on the activity of soil organic matter transforming enzymes and the quantification of soil-bound and free activity. *Plant Soil* **338**, 99–110 (2011)
28. Kandeler, E., Gerber, H.: Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils* **6**, 68–72 (1988)
29. Kandeler, E.: Nitrate reductase activity. In: Schinner, F., Ohlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R. (eds.) *Methods in Soil Biology*, pp. 176–179. Springer, Berlin (1996)
30. Singh, N.B., Khare, A.K., Bhargava, D.S., Bhattacharya, S.: Effect of initial substrate pH on vermicomposting using *Perionyx excavatus* (Perrier, 1872). *Appl. Ecol. Environ. Res.* **4**, 85–97 (2005)
31. Castkova, T., Hanc, A.: Change of the parameters of layers in a large-scale grape marc vermicomposting system with continuous feeding. *Waste Manag. Res.* (2018). <https://doi.org/10.1177/0734242x18819276>
32. Yadav, A., Garg, V.K.: Recycling of organic wastes by employing *Eisenia fetida*. *Bioresour. Technol.* **102**, 2874–2880 (2011)
33. Hidayati, N., Ali, U., Murwani, I.: Chemical composition of vermicompost made from organic wastes through the vermicomposting and composting with the addition of fish meal and egg shells flour. *J. Pure App. Chem. Res.* **6**, 127–136 (2017)
34. Talashilkar, S.C., Bhangerath, P.P., Mehta, V.B.: Changes in chemical properties during composting of organic residues as influenced by earthworm activities. *J. Indian Soc. Soil Sci.* **47**, 50–53 (1999)
35. Hanc, A., Castkova, T., Kuzel, S., Cajthaml, T.: Dynamics of a vertical-flow windrow vermicomposting system. *Waste Manag. Res.* **35**, 1121–1128 (2017)
36. Torres-Climent, A., Gomis, P., Martín-Mata, J., Bustamante, M.A., Marhuenda-Egea, F.C., Pérez-Murcia, M.D., Pérez-Espinoza, A., Paredes, C., Moral, R.: Chemical, thermal and spectroscopic methods to assess biodegradation of winery-distillery wastes during composting. *PLoS ONE* (2015). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138925>
37. Castkova, T., Hanc, A.: Change of the parameters of layers in a large-scale grape marc vermicomposting system with continuous feeding. In: *Proceedings Sardinia 2017/Sixteenth International Waste Management and Landfill Symposium*, pp. 1–11. S. Margherita di Pula, Cagliari, Italy (2017)
38. Thompson, W., Leege, P., Millner, P., Watson, M.E.: *Test methods for the examination of composts and composting*. The US composting council, US government printing office, Bethesda (2003)
39. Zmora-Nahum, S., Markovitch, O., Tarchitzky, J., Chen, Y.: Dissolved organic carbon (DOC) as a parameter of compost maturity. *Soil Biol. Biochem.* **37**, 2109–2116 (2005)
40. Hue, N.V., Liu, J.: Predicting compost stability. *Compost Sci. Util.* **3**, 8–15 (1995)
41. Barois, I., Lavelle, P.: Changes in respiration rate and some physicochemical properties of a tropical soil during transit through *Pontoscolex corethrurus* (glossoscolecidae, oligochaeta). *Soil Biol. Biochem.* **18**, 539–541 (1986)
42. Aria, M., Monroy, F., Domınguez, J.: C to N strongly affects population structure of *Eisenia fetida* in vermicomposting system. *Eur. J. Soil Biol.* **42**, 127–131 (2006)

43. Domínguez, J., Edwards, C.A.: Relationship between composting and vermicomposting. In: Edwards, C.A., Arancon, N.Q., Sherman, R. (eds.) *Vermiculture Technology*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton (2011)
44. Gómez-Brandón, M., Lores, M., Dominguéz, J.: Changes in chemical and microbiological properties of rabbit manure in a continuous-feeding vermicomposting system. *Bioresour. Technol.* **128**, 310–316 (2013)
45. Fernández-Gómez, M.J., Díaz-Raviña, M., Romero, E., Nogales, R.: Recycling of environmentally problematic plant waste generated from greenhouse tomato crops through vermicomposting. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **10**, 697–708 (2013)
46. Fernández-Gómez, M.J., Romero, E., Nogales, R.: Feasibility of vermicomposting for vegetable greenhouse waste recycling. *Bioresour. Technol.* **101**, 9654–9660 (2010)
47. Nogales, R., Cifuentes, C., Benítez, E.: Vermicomposting of winery wastes: a laboratory study. *J. Environ. Sci. Health B* **40**, 659–673 (2005)
48. Romero, E., Fernández-Bayo, J., Díaz, J.M.C., Nogales, R.: Enzyme activity and diuron persistence in soil amended with vermicompost derived from spent grape mars treated with urea. *Appl. Soil. Ecol.* **44**, 198–204 (2010)
49. Pramanik, P., Ghosh, G.K., Ghosal, P.K., Banik, P.: Changes in organic—C, N, P and K and enzyme activities in vermicompost of biodegradable organic wastes under liming and microbial inoculants. *Bioresour. Technol.* **98**, 2485–2494 (2007)

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

5.3. Částková (Hřebečková), T., Hanč, A. (2019). Změny parametrů vrstev vermikompostování matoliny ve velkém měřítku v systému průběžného krmení

Název: Change of the parameters of layers in a large-scale grape marc vermicomposting system with continuous feeding

Autoři: Tereza Částková (Hřebečková), Aleš Hanč

Publikováno v časopise: Waste Management & Research. 37, 826-832

Informace o časopise: IF= 2,015 (2018); Sage; ISSN: 0734-242X

Change of the parameters of layers in a large-scale grape marc vermicomposting system with continuous feeding

Waste Management & Research
2019, Vol. 37(8) 826–832
© The Author(s) 2019
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/0734242X18819276
journals.sagepub.com/home/wmr
SAGE

T Částková  and A Hanč

Abstract

The main by-product of wine-making is grape marc. With proper treatment, grape marc may return to the vineyard as a fertiliser. This study deals with the vermicomposting of grape marc in a continuous feeding system in outdoor conditions for more than 12 months. The N-NH_4^+ , dissolved organic carbon (DOC), and $\text{N-NH}_4^+/\text{N-NO}_3^-$ contents were greater in the top layers. The pH value was about 8 in all the layers. The electrical conductivity was the greatest in the bottom layer. The ion-exchange capacity did not modify significantly during vermicomposting. The microbial biomass was the greatest in the upper layer, as well as the number and the biomass of the earthworms. The process of vermicomposting seems to be an ideal way of processing residues from the winemaking industry. This vermicompost has very good properties for use as a fertiliser, and for returning the nutrients and organic matter to the soil, for example, in a vineyard.

Keywords

Vermicomposting, large-scale system, continuous feeding, grape marc, *Eisenia andrei*, phospholipid fatty acid profiles

Received: 23rd July 2018, accepted 13th November 2018 by Editor in chief P. Agamuthu.

Introduction

Grapes are one of the world's most prevailing fruit crops, with a global production of about 74.5 million tonnes, of which around 63,533 tonnes are produced in the Czech Republic (in 2014). About 80% of the total grape production is used in wine-making (FAOSTAT, 2017). The total area of grape vineyards in the Czech Republic reached 0.49% of the agricultural land (in May 2016) (CSO, 2017). Grape marc is the residue from the wine industry remaining after grape crushing and pressing. It consists of the stalks, skins, and pulps from grape (60%), and grape seeds (40%) (Domínguez et al., 2016; Roberts et al., 2008). Grape marc is rich in essential macronutrients and beneficial substances, which help to increase water-holding capacity, to reduce temperature fluctuations, and to supply other nutrients (Flavel et al., 2005). One of the ways to properly recycle grape marc is vermicomposting, which accelerates the organic-matter stabilisation (Edwards et al., 2011).

Vermicomposting is defined as a method of mesophilic aerobic degradation of organic matter based on the activity of certain species of earthworms. Vermicomposting uses species that live in the upper layer of soil – epigeic (McLean and Parkinson, 1998). The most frequently used are *Eisenia fetida* and *Eisenia andrei* (Domínguez and Edwards, 2011). The earthworms facilitate the decomposition processes of the biological materials, and thus they accelerate the mineralisation of the organic matter. They also affect the transport of the ions in the soil under certain conditions (Elad and Shtienberg, 1994). The earthworms affect the amount of

nutrients in the soil that are available to plants (Gómez-Brandón and Domínguez, 2014), because most of these nutrients are contained in the urine and the mucus of the earthworms (Barois and Lavelle, 1986). Vermicompost has the same utilisation as compost, but moreover, it can be effectively used to reduce soil contamination by heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons, and chlorinated pesticides (Sakakibara, 2006; Santner and Estelle, 2009; Zhang et al., 2014). The use of vermicompost could be seen as an alternative to traditional fertilisers (manure, slurry, mineral fertilisers, etc.) (Lazcano et al., 2013).

Grape marc was previously vermicomposted by Domínguez et al. (2014), Domínguez et al. (2016) and Domínguez et al. (2017) in their vermireactors with *E. andrei*, and by Fernández-Gómez et al. (2011) in an indoor reactor with *E. fetida*. Gómez-Brandón et al. (2011) also vermicomposted grape marc, but in plastic containers. Likewise, Nogales et al. (2005) and Romero et al. (2009) vermicomposted grape marc, but most of them

Department of Agroenvironmental Chemistry and Plant Nutrition, The Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic

Corresponding author:

T Částková, Department of Agroenvironmental Chemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiodiversity, Food and Natural Resources, The Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcka 129, Prague 165 21, Czech Republic.
Email: castkovat@af.czu.cz

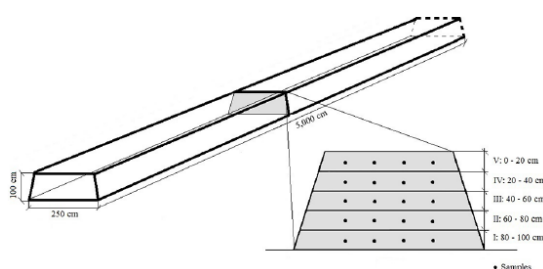


Figure 1. Diagram of the large-scale vermicompost system in Mikulčice, Czech Republic.

carried out their experiments in a system with single feeding of the earthworms and mostly in laboratory conditions. The present work deals with the evaluation of the layers, and the age of the profile from a physico-chemical and microbiological viewpoint in a large-scale operational grape marc vermicomposting system with the continuous feeding of earthworms.

Material and methods

Experimental design

The experiment was conducted using large-scale vermicomposting conditions at the collective farm in Mikulčice, Czech Republic. The vermicomposting heap was placed under the roof and regularly irrigated to optimum humidity (about 80%). The windrow vermicomposting was set up on a ground plan $2.5\text{ m} \times 50\text{ m}$. A bedding layer, consisting of manure and grass with earthworms (*E. andrei* B.), with a density of approximately 50 earthworms per litre, was placed first. Subsequent layers of fresh untreated grape marc (with seeds) were added every 1 or 2 weeks depending on the season and the feeding activity of earthworms. The earthworms (*E. andrei*) were obtained from a culture bank at the Filip and Filip farm, Czech Republic. The spent grape marc was obtained from a winery industry in Habanske sklepy, Velke Bilovice, Czech Republic.

Samples were taken up from the cross profiles of different depths. Depth placement and the average age of each layer were as follows:

- V: 0–20 cm, <3 months
- IV: 20–40 cm, 3–6 months
- III: 40–60 cm, 6–9 months
- II: 60–80 cm, 9–12 months
- I: 80–100 cm, >12 months

Four samples were taken systematically from each layer as shown in Figure 1. Each sample was collected to represent the specific layer. The weight of each sample was about 1 kg. Earthworms were separated from each sample, counted, weighed, frozen, and lyophilised. The sample without earthworms was then

divided into three parts. The first part of the sample was stored at 4°C for pH and electrical conductivity (EC) analysis. The second part of the sample was dried in a dryer at 35°C for element analysis, including N-NH_4^+ , N-NO_3^- , and DOC (dissolved organic carbon). The third part was frozen at -20°C and then lyophilised for PLFA (phospholipid fatty acid) analysis.

Physico-chemical analyses

The active pH value and the EC were conducted on samples mixed with demineralised water (1:5 w/v wet basis) using a WTW pH 340i and WTW cond 730, respectively, according to BSI EN 15933 (2012). The ion-exchange capacity (IEC) was evaluated conductometrically according to Váchalová et al. (2014). For the determination of the total carbon (C_{tot}) and nitrogen (N_{tot}), a CHNS Vario MACRO cube (Elementar Analysensysteme GmbH, Germany) analyser was applied. In this instrument, about 25 mg of the sample was burned in a catalytic furnace, and subsequently C_{tot} and N_{tot} were determined by using the thermal conductivity detector. The total contents of phosphorus, potassium, and magnesium were determined by decomposition utilising a wet method in a closed system with microwave heating using an Ethos 1 system (MLS GmbH, Germany) (Hanc and Vasak, 2015). The contents of N-NH_4^+ , N-NO_3^- , DOC, and the available portions of phosphorus, potassium, and magnesium were determined in CAT solution (0.01 mol l^{-1} CaCl_2 and 0.002 mol l^{-1} diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA)) at the rate of 1:10 (w/v) according to the International BSI Standard EN 13651 (2001). The N-NH_4^+ , N-NO_3^- , and DOC contents were measured colorimetrically using the SKALAR SANPLUS SYSTEM[®]. The total and available element concentrations were determined using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES, VARIAN VistaPro, Varian, Australia) with axial plasma configuration.

Biological analysis

The number and the biomass of the earthworms were determined. Earthworms were manually separated from the vermicompost and counted. Afterwards, they were washed and weighed for biomass calculation. After a few hours (about 5 h) they were washed and weighed again. Then they were frozen and lyophilised for element analysis.

The groups of microorganisms were detected using PLFA analysis done by the Institute of Microbiology of the CAS, v.v.i. Samples for the PLFA analysis (0.3–0.5 g – depending on an absorption of material) were extracted in triplicate using a chloroform–methanol–phosphate buffer (1:2:0.8; v/v/v) according to Bligh and Dyer (1959). The free methyl esters of PLFAs were analysed by tandem gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) (450-GC, 240-MS Varian, Walnut Creek, CA, USA) according to Šnajdr et al. (2008). Methylated fatty acids were identified according to their mass spectra using a bacterial and lipid standard fatty acid methyl esters obtained from Sigma-Aldrich (Šnajdr et al., 2011). Bacteria were determined on the

Table 1. Physico-chemical properties of Layers V–I in the large-scale vertical-flow windrow vermicomposting system.

Layer (age)	Dry matter [%] [$p=0.0019$]	pH/H ₂ O [$p=0.0035$]	EC [$\mu\text{S cm}^{-1}$] [$p=0.0015$]	C _{tot} [%] [$p=0.0018$]	N _{tot} [%] [$p=0.0140$]	C/N [$p=0.0054$]
V (<3 months)	41.06 SD 0.88 ^b	7.73 SD 0.15 ^b	812 SD 17.68 ^{ab}	46.51 SD 0.58 ^b	2.10 SD 0.14 ^b	22.28 SD 1.77 ^b
IV (3–6 months)	39.20 SD 0.85 ^{ab}	8.08 SD 0.13 ^{ab}	805 SD 10.00 ^{ab}	45.06 SD 0.72 ^{ab}	2.19 SD 0.13 ^{ab}	20.58 SD 1.04 ^{ab}
III (6–9 months)	38.07 SD 1.37 ^{ab}	7.98 SD 0.10 ^{ab}	729 SD 31.98 ^b	44.87 SD 0.61 ^{ab}	2.24 SD 0.18 ^{ab}	20.14 SD 1.87 ^{ab}
II (9–12 months)	35.32 SD 1.12 ^{ab}	8.08 SD 0.10 ^{ab}	643 SD 34.03 ^b	43.04 SD 0.59 ^a	2.29 SD 0.04 ^{ab}	18.83 SD 0.41 ^{ab}
I (>12 months)	26.68 SD 1.06 ^a	8.68 SD 0.10 ^a	1433 SD 131.75 ^a	37.30 SD 1.02 ^a	2.64 SD 0.14 ^a	14.18 SD 1.05 ^a

Values are the means SD ($n=4$). Different letters [in superscript] in a column indicate significant differences (Kruskal–Wallis ANOVA, $p<0.05$).

basis of i14:0, i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, 16:1 ω 9, 16:1 ω 7, 16:1 ω 5, 10Me-16:0, i17:0, a17:0, cy17:0, 17:0, 10Me-17:0, 18:1 ω 7, 10Me-18:0, cy19:0. The gram positive (G⁺) bacteria biomass were quantified as the sum of i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, and a17:0. The gram negative (G⁻) bacteria were determined on the basis of 16:1 ω 7, 18:1 ω 7, cy17:0, cy19:0, 16:1 ω 5. 10Me-17:0, 10Me-18:0, 10Me-16:0 were used for actinobacteria and 18:2 ω 6,9 for fungi. The total biomass was quantified as the sum of all the markers together with 16:0 and 18:1 ω 9. All basis were chosen according to Oravec et al. (2004) and Šnajdr et al. (2011).

Statistical analyses

Analysis of normality (Kolmog–Smirnov, Lilliefors, Shapiro–Wilk W tests), homogeneity (Cochran, Hartley, Bartlett test), and Kruskal–Wallis ANOVA ($p<0.05$) for analyses of variance were performed using the STATISTICA 12 software (StatSoft, Tulsa, USA). Analysis of multiple linear regression and correlation – Pearson's correlation coefficient (at the 0.05 level) were performed using the IBM® SPSS Statistics® software.

Results and discussion

The pH value of grape marc was 7.64 and the EC was 416.5 $\mu\text{S cm}^{-1}$. The pH value and the EC increased during the vermicomposting process (the individual layers differed from each other by 0.29 on average at pH value and about 239.8 $\mu\text{S cm}^{-1}$ on average at EC). In a previous experiment done by Domínguez et al. (2016), the EC was lower in vermicompost than in grape marc, however this experiment was conducted in a pilot-scale vermireactor housed in a greenhouse. In our experiment, the EC was greater in vermicompost (the greatest was in Layer I – the oldest layer) than in grape marc, as shown in Table 1. It can be caused by washing the salts down into the profile and by the loss of organic matter. The pH value was about 8 in all the layers, but there was a significant difference between Layer I and Layer V (Table 1). This result was shown as well in the study conducted by Fernández-Gómez et al. (2011), who vermicomposted separately damaged tomato fruits, olive-mill and biosolids, cattle

manure, and winery waste in a system with a single feeding of *E. fetida* earthworms. The increasing pH value observed during the vermicomposting process is probably owing to the formation of alkaline-type intermediates in the decomposition of organic acids by the action of microorganisms (Romero et al., 2007). The greatest C_{tot} and the lowest N_{tot} content was found in the upper layer. This was likely related to its C/N ratio, which was also greater in the top layer with a value of 22.3 (Table 1). A significant increase in N_{tot} (Tab.1) can be owing to the reduction of the organic matter and the nitrogen release during the mineralisation process (Ferrer et al., 2001) and it also can be caused by washing the nutrients down in profile. Another of the possible reasons is development of the nitrogen-binding microorganisms, because the anaerobic process promotes nitrogen fixation (Ferrer et al., 2001) and the lower layer is a more anaerobic environment compared with the upper layers. The C_{tot}, N_{tot}, and the C/N ratio were greater in our experiment than in the experiment conducted by Domínguez et al. (2016), in which the C/N ratio was 12.68 in 112-days-old vermicompost.

The stability of the final vermicompost can be evaluated by parameters N-NH₄⁺, N-NH₄⁺/N-NO₃⁻, DOC, IEC, and IEC/C_{tot} (Table 2) (Bernal et al., 2009). Nitrogen mineralisation plays an important role in using the vermicompost as a fertiliser (Atiyeh et al., 2000). This mineralisation is regulated by the availability of dissolved organic nitrogen and ammonium. The average value of ammonium nitrogen was 25.81 mgN kg⁻¹, in our experiment. A statistically significant difference was found only between the first layer and Layer III, because this layer (Layer I) consisted of different materials (manure and grass with earthworms) than the other layers. The DOC decreased with the age of the layers (from 13,559 mgC kg⁻¹ in Layer V to 9065 mgC kg⁻¹ in Layer I) (Table 2). In comparison with the grape marc vermicomposting experiment conducted by Gómez-Brandón et al. (2011), where the DOC was 4100 mg kg⁻¹, we observed greater contents of DOC in all of the layers, as well as greater contents of nitrate nitrogen in Layers I, II, V (which was 80 mg kg⁻¹ in their experiment), but not in Layers III and IV. The ammonium nitrogen was higher in their experiment than in ours (190 mg kg⁻¹ in their experiment). Their study also utilised *E. andrei* earthworms, but in plastic containers in laboratory conditions in a system with a single feeding, and it was run for

Table 2. Stability indicators of Layers V – I in the large-scale vertical-flow windrow vermicomposting system.

Layer (age)	N-NH ₄ ⁺ (mg N kg ⁻¹) (p=0.0095)	N-NH ₄ ⁺ /N-NO ₃ ⁻ (p=0.0036)	DOC (mg C kg ⁻¹) (p=0.0126)	IEC (mmol _L 100g ⁻¹) (p=0.1723)	IEC/C _{tot} (p=0.3723)
V (<3 months)	22.97 SD 3.43 ^{ab}	0.27 SD 0.06 ^{ab}	13559 SD 1970.46 ^b	58.00 SD 10.20 ^a	1.25 SD 0.21 ^a
IV (3–6 months)	18.31 SD 3.25 ^{ab}	0.45 SD 0.15 ^b	13211 SD 2161.01 ^{ab}	62.50 SD 3.70 ^a	1.39 SD 0.09 ^a
III (6–9 months)	17.12 SD 3.09 ^b	0.39 SD 0.12 ^b	12981 SD 697.46 ^{ab}	63.75 SD 15.26 ^a	1.42 SD 0.35 ^a
II (9–12 months)	24.81 SD 1.43 ^{ab}	0.14 SD 0.02 ^{ab}	10473 SD 1219.02 ^{ab}	64.25 SD 2.06 ^a	1.49 SD 0.09 ^a
I (>12 months)	45.82 SD 17.51 ^a	0.11 SD 0.03 ^a	9065 SD 677.88 ^a	50.25 SD 5.74 ^a	1.35 SD 0.18 ^a

Values are the means SD (n=4). Different letters (in superscript) in a column indicate significant differences (Kruskal–Wallis ANOVA, p < 0.05).

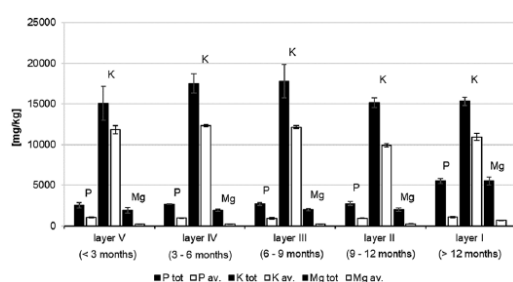


Figure 2. Changes in the total and available phosphorus, potassium, and magnesium (mg kg⁻¹) in Layers V–I of the large-scale vertical-flow windrow vermicomposting system. Values are the means SD (n=4).

15 days. In the current experiment, the IEC increased (although not significantly) through the profile and ranged from 58 to 64 mmol+ 100 g⁻¹ (Table 2). The IEC/C_{tot} ratio increased, but not significantly, with the age of the layers, except the lowest layer, where the ratio dropped to 1.35 (Table 2). Insignificant differences may be owing to the large proportion of seeds in the grape marc.

The observed total and available phosphorus, potassium, and magnesium values in the individual layers are shown in Figure 2. The total amount of phosphorus (P_{tot}) ranged from 0.26% to 0.55% and was directly proportional to the age of the layers. The greatest P_{tot} value was found in the oldest layer (Layer I). The P_{tot} content was 5522 mg kg⁻¹, of which 19.7% was available phosphorus.

The total amount of potassium ranged from 1.51% to 1.78%, in all the layers. An upward trend can be expected here, as in the case of phosphorus. However, this was not confirmed, the maximum values were obtained in Layer III (17,790 mg kg⁻¹).

The total magnesium content ranged from 0.19% to 0.55%, as can be seen from the graph. The greatest total magnesium content was measured in the first (the oldest) layer, and the value was similar to the P_{tot} (Mg_{tot} 5518 mg kg⁻¹), the other layers being nearly balanced and reaching a maximum of 1966 mg kg⁻¹ (Layer II).

Bhadoria and Ramakrishnan (1989) and Arthur et al. (2012) claim that the earthworms affect the amount of nutrients that are available to plants. Nutrients can be accumulated by the earthworms,

thereby reducing their mobility (Pan and Wang, 2009). At the same time, earthworms exude a certain amount of available nutrients (Shipitalo and Protz, 1989). The proportion of the available content in the total content ranged in the whole profile from 20% to 42% for phosphorus, 65% to 79% for potassium, and 11% to 13% for magnesium.

The low concentration of the earthworms can be affected by some of the experimental factors, which change during the vermicomposting process, such as the pH value, salinity, or the presence of the ammonium ion (N-NH₄⁺). The greatest number of earthworms was in the youngest layer, which was 2 weeks old. The number of earthworms in Layer V was 209 pcs in 1 kg (92.07% of the total number of earthworms) (Table 3). In Layer IV (at a depth of 20–40 cm), the number of earthworms was 18 pcs in 1 kg (7.93% of the total number of earthworms) (Table 3). Domínguez et al. (2016) conducted their white grape marc vermicomposting experiment in a single feeding system. The number of earthworms per square metre in their experiment was about 700 pcs m⁻² after 70 days of vermicomposting and the biomass of the earthworms was approximately 210 g m⁻². In the current study, the number and the biomass of earthworms, as well as the microbial biomass, was the greatest in the upper layer. This layer provides sufficient amounts of carbon, oxygen, and food for the earthworms.

Earthworms are able to accumulate a significant amount of nutrients including nitrogen, phosphorus, potassium, etc. (Arthur et al., 2012). The amount of the elements received by the earthworms was higher with the increasing mineralisation of the primary organic matter (Table 3).

All the layers showed significantly greater contents of bacteria than fungi (ratios of bacteria to fungi were as follows: Layer I 32.6; Layer II 7.5; Layer III 7.9; Layer IV 7.9; and Layer V 5.4), which is in accordance with laboratory vermicomposting experiments of grape marc in a system with a single feeding conducted by Gómez-Brandón et al. (2011) and Romero et al. (2009). The lowest value for the bacterial/fungal ratio (5.4) was found in the top layer. The value gradually increased with the age of the layers to 32.6 in Layer I (Figure 3). Aria et al. (2011) showed that the microbial biomass was greater in the upper layer than in the bottom layer in their vermicomposting study utilising

Table 3. Biological and chemical parameters of the earthworms in the windrow layers.

Layer (age)	Number (in 1 kg)	Biomass (g kg ⁻¹)	P _{tot} (mg kg ⁻¹)	K _{tot} (mg kg ⁻¹)	Mg _{tot} (mg kg ⁻¹)
V (<3 months)	209 SD 51	32.65 SD 7.53	8723 SD 623	9187 SD 1728	1187 SD133
IV (3–6 months)	18 SD 9	3.22 SD 1.80	9136 SD 495	10103 SD 865	1422 SD 310
III (6–9 months)	0 SD 0	0 SD 0	n.d.	n.d.	n.d.
II (9–12 months)	0 SD 0	0 SD 0	n.d.	n.d.	n.d.
I (>12 months)	0 SD 0	0 SD 0	n.d.	n.d.	n.d.

Values are the means SD ($n=4$).
n.d.: no data.

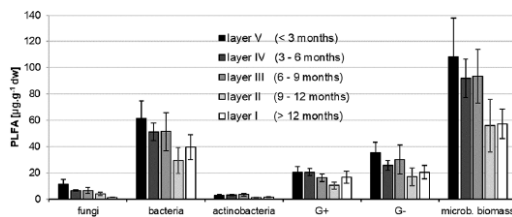


Figure 3. Changes in the fungal, bacterial, and total microbial PLFAs biomass in the layers of the large-scale vertical-flow windrow vermicomposting system. Values are the mean SD.

a continuous feeding system. In fact, in their experiment, the bacterial and fungal activities were the greatest in the upper layer (bacterial PLFAs approximately $700 \mu\text{g g}^{-1} \text{dw}$, fungal PLFAs about $20 \mu\text{g g}^{-1} \text{dw}$) and the lowest in the bottom layer (bacterial PLFAs about $400 \mu\text{g g}^{-1} \text{dw}$, fungal PLFAs about $12 \mu\text{g g}^{-1} \text{dw}$). Their experiment was a continuous feeding system in a pilot-scale vermireactor housed in a greenhouse, and the earthworms (*E. andrei*) were fed by the cow manure. In our experiment, the greatest bacterial and fungal activities were also found in the youngest layer (bacterial PLFAs about $61 \mu\text{g g}^{-1} \text{dw}$, fungal PLFAs about $11 \mu\text{g g}^{-1} \text{dw}$ (Figure 3)). The dominant microorganisms in vermicompost were bacteria, namely G- bacteria, followed by G+ bacteria and fungi. Although, Gómez-Brandón et al. (2012) reported that the concentrations of G-, G+, and fungi can be reduced by the activity of earthworms, the highest concentration of these microbial groups was found in the youngest layer (Layer V), which was rich in the earthworms. But the conditions and the consistence of feeding material of both experiments were different. Actinobacteria were almost suppressed, because the actinobacteria reach higher values at a more acidic pH value (Rousk et al., 2010). The presence of bacteria is caused by elevated levels of water and easily degradable substances. The fungal colonies are kept at low concentrations throughout the process because fungal cells serve as a food source for the earthworms (Schönholzer et al., 1999) and the fungal colonies are also influenced by the pH values, they are

reproduced better at lower pH values, and on the contrary, at higher pH values their production decreases (Gock et al., 2003). Earthworms secrete nutrients and thus they support the activity of microorganisms (Shipitalo and Protz, 1989). The microbial biomass gradually decreased with the age of the layers of grape marc as well as the number of earthworms. But the microbial biomass was greater in Layer I than in Layer II, because Layer I consisted of different material (Layer I – manure and grass; Layer II – grape marc). Owing to the high IEC value in Layer II, the microorganisms were unable to obtain nutrients from the organic matter, and therefore this layer exhibited the lowest microbial biomass. It can also be assumed that this layer was already fully stabilised and matured.

Correlation (Pearson's correlation coefficient) and multiple linear regression analysis with use of predictive models for the potential effect of microorganisms on the main parameters of vermicompost were performed. By computing the individual regression coefficients (independent variables), we are able to tell, what extent they affect the dependent variables. It should be borne in mind that these models are only theoretical. Based on the dependence course (equation (1)), supplemented by the correlation analysis, it is possible to say that the C/N parameter is statistically significantly influenced by all microorganisms except actinobacteria. The strongest dependence was found in fungal biomass. The C/N ratio will be higher if more fungi are present in the vermicompost (assuming the content of other microorganisms will be constant). Conversely, for example, the C/N ratio will be lower if more G+ bacteria are present in the vermicompost (assuming the content of other microorganisms will be constant).

$$y' = 18,151 + 0,514x_1 + 1,285x_2 - 0,641x_3 - 1,616x_4 - 1,674x_5 + 0,123x_6 \quad (1)$$

The course of the C/N ratio on microbial biomass; R square is 95.2%. Pearson's $r=0.9757$. Where x_1 is fungal biomass, x_2 bacterial, x_3 actinobacterial, x_4 G+ bacterial, x_5 G- bacterial, and x_6 total microbial biomass.

N-NH_4^+ (Pearson's $r=0.894$) and EC (Pearson's $r=0.935$) are statistically significantly influenced only by fungal biomass. If

the fungal content decreases in the vermicompost, the value of that parameter (N-NH_4^+ or EC) will be also decreased. The contents of N-NO_3^- (Pearson's $r=0.963$) and DOC (Pearson's $r=0.92$) are statistically significantly influenced by fungal biomass, but also by biomass of actinobacteria. If the fungal or actinobacterial content increase (assuming the content of other microorganisms will be constant), the N-NO_3^- content will be reduced (indirect dependence). Between fungi and actinobacteria, and DOC, a direct dependence was found. Thus, if the fungal or actinobacterial content increase (assuming the content of other microorganisms will be constant), the DOC content will increase. The pH value (Pearson's $r=0.921$) is statistically significantly influenced by the biomass of fungi, actinobacteria, and G- bacteria. An indirect dependence was found between the biomass of these microorganisms and the pH value. The IEC parameter (Pearson's $r=0.792$) is not statistically significantly influenced by any microbial biomass.

Conclusions

The youngest layer was characterised by a high density of earthworms, microbial biomass, high percentage of dry matter, the lowest pH, and the highest C/N owing to its high content of primary organic matter. The lowest layer showed the stability owing to its low $\text{N-NH}_4^+/\text{N-NO}_3^-$ ratio, IEC and $\text{IEC}/\text{C}_{\text{tot}}$ ratio values, and its highest contents of total and available phosphorus and magnesium.

The results of large-scale vermicomposting system were influenced by outdoor conditions and also by the high proportion of seeds in the used grape marc. A large proportion of seeds can cause a weak significance for the parameters between the layers. The properties of the oldest layer significantly differed owing to the predominance of the bedding material. The lower (older) layers were found to be more suitable as an organic fertiliser. On the other hand, the younger upper layers (rich in microorganisms) could be used for the preparation of aqueous extracts after the separation of earthworms.

Acknowledgements

The authors would like to thank Christina Baker Starrman for revision of the English text.


Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported under the NAZV project No. QJ1530034 and CIGA project No. 20172018.

ORCID iD

T Částková  <https://orcid.org/0000-0002-9586-3065>

References

- Aria M, Gómez-Brandón M, González-Porto P, et al. (2011) Selective reduction of the pathogenic load of cow manure in an industrial-scale continuous-feeding vermireactor. *Bioresource Technology* 102: 9633–9637.
- Arthur GD, Aremu AO, Kulkarni MG, et al. (2012) Vermicompost leachate alleviates deficiency of phosphorus and potassium in tomato seedlings. *HortScience* 47: 1304–1307.
- Atiyeh RM, Domínguez J, Subler S, et al. (2000) Changes in biochemical properties of cow manure during processing by earth-worms (*Eisenia andrei*, Bouché) and the effects on seedling growth. *Pedobiologia* 44: 709–724.
- Barois I and Lavelle P (1986) Changes in respiration rate and some physico-chemical properties of a tropical soil during transit through *Pontoscolex corethrurus* (glossoscolecidae, oligochaeta). *Soil Biology & Biochemistry* 18: 539–541.
- Bernal MP, Albuquerque JA and Moral R (2009) Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource Technology* 100: 5444–5453.
- Bhadoria T and Ramakrishnan PS (1989) Earthworm population dynamics and contribution to nutrient cycling during cropping and fallow phases of shifting agriculture (jhum) in north-east India. *Journal of Applied Ecology* 26: 505–520.
- Bligh EG and Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37: 911–917.
- CSO (2017). Areas under Crops Survey – as at 31 May 2016. Czech Statistical Office.
- Domínguez J and Edwards CA (2011) Biology and ecology of earthworm species used for vermicomposting. In: Edwards CA, Arancon NQ and Sherman RL (eds) *Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Waste and Environmental Management*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp.25–37.
- Domínguez J, Martínez-Cordeiro H, Álvarez-Casas M, et al. (2014) Vermicomposting grape marc yields high quality organic bio-fertiliser and bioactive polyphenols. *Waste Management & Research* 32: 1235–1240.
- Domínguez J, Martínez-Cordeiro H and Lores M (2016). *Earthworms and Grape Marc: Simultaneous Production of High-Quality Biofertilizer and Bioactive-Rich Seeds*. Chapter 8. In: Grape and Wine Biotechnology. London: Intech, pp. 167–183.
- Domínguez J, Sanchez-Hernandez JC and Lores M (2017). Vermicomposting of winemaking by-products. In: *Handbook of Grape Processing By-Products*. Greece: Academic Press, pp.55–78.
- Edwards CA, Arancon NQ and Sherman R (2011). *Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Wastes, and Environmental Management*. CRC Press, Boca Raton.
- Elad Y and Shtienberg D (1994) Effect of compost water extracts on grey mould (*Botrytis cinerea*). *Crop Protection* 13: 109.
- EN 13651 (2001). *Soil improvers and growing media - Extraction of calcium chloride/DTPA (CAT) soluble nutrients*.
- EN 15933 (2012). *Sludge, treated biowaste and soil. Determination of pH*. FAOSTAT (2017). FAO Statistical Database.
- Fernández-Gómez MJ, Nogales R, Insam H, et al. (2011) Role of vermicompost chemical composition, microbial, functional diversity and fungal community structure in their microbial respiratory response to three pesticides. *Bioresource Technology* 102: 9638–9645.
- Ferrer J, Páez G, Mármol Z, et al. (2001) Agronomic use of biotechnologically processed grape wastes. *Bioresource Technology* 76: 39–44.
- Flavel TC, Murphy DV, Lalor BM, et al. (2005) Gross N mineralization rates after application of composted grape marc to soil. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 1397–1400.
- Gock MA, Hocking AD, Pitt JJ, et al. (2003) Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. *International Journal of Food Microbiology* 81: 11–19.
- Gómez-Brandón M and Domínguez J (2014) Changes of microbial communities during the vermicomposting process and after application to the soil. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 44: 1289–1312.
- Gómez-Brandón M, Lazcano C, Lores M, et al. (2011) Short-term stabilization of grape marc through earthworms. *Journal of Hazardous Materials* 187: 291–295.

- Gómez-Brandón M, Lores M and Domínguez J (2012) Species-specific effects of epigeic earthworms on microbial community structure during first stages of decomposition of organic matter. *PLoS ONE* 72: e31895.
- Hanc A and Vasak F (2015) Processing separated digestate by vermicomposting technology using earthworms of the genus *Eisenia*. *International Journal of Environmental Science and Technology* 12: 1183–1190.
- Lazcano C, Gómez-Brandón M, Revilla P, et al. (2013) Short-term effects of organic and inorganic fertilizers on soil microbial community structure and function. *Biology and Fertility of Soils* 49: 723–733.
- McLean MA and Parkinson D (1998) Impacts of the epigeic earthworm *Dendrobaena octaedra* on oribatid mite community diversity and microarthropod abundances in pine forest floor: A mesocosm study. *Applied Soil Ecology* 7: 125–136.
- Nogales R, Cifuentes C and Benítez E (2005) Vermicomposting of winery wastes: A laboratory study. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 40: 659–673.
- Oravec O, Elhottová D, Křišťůfek V, et al. (2004) Application of ARDRA and PLFA analysis in characterizing the bacterial communities of the food, gut and excrement of saprophagous larvae of *Penthetria holosericea* (Diptera: Bibionidae): A pilot study. *Folia Microbiologica* 49: 83–93.
- Pan X and Wang X (2009). Profiling of plant hormones by mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 877: 2806–2813.
- Roberts JS, Kidd DR and Padilla-Zakour O (2008) Drying kinetics of grape seeds. *Journal of Food Engineering* 89: 460–465.
- Romero E, Fernández-Bayo J, Díaz JMC, et al. (2009) Enzyme activity and diuron persistence in soil amended with vermicompost derived from spent grape marc and treated with urea. *Applied Soil Ecology* 44: 198–204.
- Romero E, Plaza C, Senesi N, et al. (2007) Humic acid-like fractions in raw and vermicomposted winery and distillery wastes. *Geoderma* 139: 397–406.
- Rousk J, Bååth E, Brookes PC, et al. (2010) Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal* 4: 1340–1351.
- Sakakibara H (2006) Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology* 57: 431–449.
- Santner A and Estelle M (2009) Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* 459: 1071–1078.
- Schönholzer F, Hahn D and Zeyer J (1999) Origins and fate of fungi and bacteria in the gut of *Lumbricus terrestris* L. studied by image analysis. *FEMS Microbiology Ecology* 28: 235–248.
- Shipitalo MJ and Protz R (1989). Chemistry and micromorphology of aggregation in earthworm casts. *Geoderma* 45: 357–374.
- Šnajdr J, Cajthaml T, Valášková V, et al. (2011) Transformation of *Quercus petraea* litter: Successive changes in litter chemistry are reflected in differential enzyme activity and changes in the microbial community composition. *FEMS Microbiology Ecology* 75: 291–303.
- Šnajdr J, Valášková V, Merhautová V, et al. (2008) Spatial variability of enzyme activities and microbial biomass in the upper layers of *Quercus petraea* forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 2068–2075.
- Váchalová R, Borová-Batt J, Kolář L, et al. (2014) Selectivity of ion exchange as a sign of soil quality. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 45: 2673–2679.
- Zhang H, Tan SN, Wong WS, et al. (2014) Mass spectrometric evidence for the occurrence of plant growth promoting cytokinins in vermicompost tea. *Biology and Fertility of Soils* 50: 401–403.

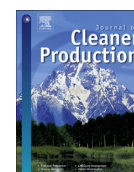
5.4. Hřebečková et al. (2019). Změny enzymatické aktivity během vermikompostovacího procesu ve velkém měřítku v systému průběžného krmení

Název: Changes of enzymatic activity during a large-scale vermicomposting proces with continuous feeding

Autoři: Tereza Hřebečková, Lucie Wiesnerová, Aleš Hanč

Publikováno v časopise: Journal of Cleaner Production. 239, 118127

Informace o časopise: IF= 6,395 (2018); Elsevier; ISSN: 0959-6526



Changes of enzymatic activity during a large-scale vermicomposting process with continuous feeding



T. Hřebecková^{a,*}, L. Wiesnerová^b, A. Hanč^a

^a Department of Agroenvironmental Chemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, The Czech University of Life Sciences Prague, Kamycka 129, Prague, 165 21, Czech Republic

^b Department of Horticulture, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, The Czech University of Life Sciences Prague, Kamycka 129, Prague, 165 21, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 August 2018

Received in revised form

19 August 2019

Accepted 20 August 2019

Available online 22 August 2019

Handling editor: CT Lee

Keywords:

Enzymatic activity

Vermicomposting heaps

Aged vermicompost

Continuous feeding

Eisenia andrei

Phospholipid fatty acids analysis

ABSTRACT

The presented experiment determined the enzymatic activity of eight different enzymes in three types of aged vermicomposts (from household biowaste; malt house sludge mixed with agricultural waste; grape marc). The vermicomposting was conducted in the large-scale systems of heaps with continuous feeding of the earthworms, which is applicable in practice. All vermicomposting heaps were divided into five layers of different depths, depending on the age of these layers. In all heaps, the highest number and biomass of earthworms occurred in the youngest layers, as did the highest activity of bacteria or fungi. The highest activity of all eight measured enzymes occurred in the vermicomposting process with household biowaste. The lowest activity of all enzymes showed the arylsulphatase, which did not exceed $66 \mu\text{mol 4-methylumbelliferyl sulphate potassium salt. g}^{-1}\text{.h}^{-1}$. The highest enzyme activity was detected for lipase, where all values were higher than $5382 \mu\text{mol 4-methylumbelliferyl-caprylate.g}^{-1}\text{.h}^{-1}$. There were marked differences between the layers in all vermicomposting heaps.

© 2019 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Biodegradable waste is currently processed by conventional biodegradation methods such as composting and an anaerobic decomposition (Björklund et al., 1999), or a large part of biodegradable waste is incinerated (sludge, straw, plant residues) (Faaij, 2006). The less frequently used and more gentle method that can contribute to cleaner production is vermicomposting. Vermicomposting is mesophilic aerobic fermentation using epigeic earthworms which live in upper layers like *Eisenia andrei* or *Eisenia fetida* (Mc Lean and Parkinson, 1998). Organic material (ideally pre-fermented) with a C:N ratio of 25:1–30:1 serves as a food for earthworms. The ideal temperature for vermicomposting is about 22 °C, and humidity should range from 70 to 80% (Edwards et al., 2011). The earthworms usually process any organic material (Gaddie and Douglas, 1975), such as sewage sludge, animal waste, crop residues (Sinha et al., 2010), household and garden waste and

some industrial waste (Atiyeh et al., 2000). Unsuitable materials for vermicomposting are the materials with high salt content or thicker layers of fresh leaves or grass, meat and dairy products (Sinha et al., 2008).

This experiment deals with vermicomposting of household waste, agricultural waste with malt house sludge and grape marc. Household waste is the waste from apartment buildings, housing areas and gardens over four seasons (Hanc et al., 2017). Agricultural waste includes some chips, straw, apples, grass or poppies and it is mixed with malt house sludge, which is difficult to dispose. This sludge remains during the barley soaking process at the bottom of the tank. Grape marc is formed after grapes crushing, draining and pressing and is the most important by-product of the wine industry. Most commonly, grape marc contains about 60% vol of stalks, peel and pulp and 40% vol of grape seeds (Flavel et al., 2005).

Enzymes are the most numerous groups of biocatalysts, with specific proteins produced inside living cells which catalyse biological reactions. The International Commission divided the enzymes into six main classes: oxidoreductases, transferases, hydrolases, lyases, isomerases and ligases. The enzymes selected for this experiment were based on the evaluation of the available

* Corresponding author.

E-mail address: hrebeckova@af.czu.cz (T. Hřebecková).

data. Selected enzymes play a part in the metabolic processes involved in the decomposition of organic matter (β -D-glucosidase, acid phosphatase, arylsulphatase, lipase, chitinase, cellobiohydrolase, alanine and leucine aminopeptidase) and fall into the hydrolase class, which catalyses hydrolytic cleavage.

β -glucosidases form a very heterogeneous group of enzymes hydrolysing glucose oligosaccharides (Brenda, 2019). Acid phosphatases catalyse the hydrolysis of monoesters and phosphoric anhydrides, resulting in mineralisation of organic phosphorus (Enowashu et al., 2009). Arylsulphatase catalyses the hydrolysis of the aryl-sulphate anion by interrupting the O–S bond. Arylsulphatase contributes to the mineralisation of the organic sulphur to $S-SO_4^{2-}$ (Tabatabai and Bremner, 1970). Lipases hydrolyse acylglycerols, containing fatty acid chains with a carbon number ≥ 10 , to fatty acids and glycerol. At the same time, ester bonds between glycerol and fatty acids are released (Brenda, 2019). Chitinases are an essential group of enzymes responsible for chitin degradation. They hydrolyse the glucosidic bonds of chitin, releasing the smaller nitrogen-containing organic compounds (Gooday, 1994). Cellobiohydrolase hydrolyses β -D-glucosidic bonds in cellulose and cello-tetraose and releases cellobiose or glucose from the cellulose chain. It participates with endocluvanase and β -glucosidase in the decomposition of structural polymers (Mertz et al., 2007). Aminopeptidases are among exopeptidases, which are the enzymes digesting proteins during digestion. Alanine and leucine aminopeptidases release terminal N from amino acids, peptides, amides or arylamides, alanine aminopeptidase, especially from alanine or proline and leucine aminopeptidase, mainly from leucine or proline (Wickström et al., 2011).

Vermicomposting of household waste or grape marc has previously been the subject of several studies (household waste: Abbasi et al., 2015; grape marc: Domínguez et al., 2014; Gómez-Brandón et al., 2011b). However, all available studies were concerned with small-scale conditions and in the system of single feeding. Also, in some studies the enzymatic activity was determined, but only for a few enzymes (Fernández-Gómez et al. (2010a), Fernández-Gómez et al. (2010b) and Nogales et al. (2005) determined the activity of phosphatase, β -glucosidase, dehydrogenase and urease; Romero et al. (2010) determined only dehydrogenase and urease). The aim of the manuscript is to determine the enzymatic activity of eight different enzymes in three types of aged vermicomposts. The novelty of this study consists of the evaluation of changes in activity of eight enzymes between the layers, and the age of the profile in a large-scale windrow vermicomposting system with continuous feeding of earthworms *Eisenia andrei*. Newly determines the enzymatic activity of lipase, cellobiohydrolase, leucine aminopeptidase and alanine aminopeptidase in the vermicomposts. This vermicomposting took place in outdoor conditions in the system of large heaps, which is useable in practice. This system is disposing the waste at the site of its production (in the individual companies).

2. Material and methods

2.1. Experimental design

Aged vermicomposting (vermicomposting system with continuous feeding of earthworms, where the layers are gradually increasing in age) using the windrow method was set up in May 2015 at three establishments in the Czech Republic, with different biowastes, under outdoor conditions. The vermicompost with household biowaste was in Uherský Brod; the vermicompost with a mixture of malt house sludge (20%vol) and agricultural waste (80% vol) was in Veleliby u Nymburka; and the vermicompost with grape marc was in Mikulčice. The bedding layer containing earthworms

(*E. andrei*), with a density about 50 earthworms per litre, was placed first. Other layers of biowaste were added every two weeks. The composition of the biodegradable material depended on the season, except the grape marc. The individual parameters of the household biowaste varied (in each layer) depending on the season. Average values for this type of biowaste are: Dry matter 32.5%; pH/H₂O 5.4 and C:N 26.7. Detailed analysis of household biowaste is mentioned in the article by Hanc et al. (2011). Average values for malt house sludge were: Dry matter 11.8%; pH/H₂O 8.3; EC: 2088 μ S/cm and C:N 6. Average values for grape marc were: Dry matter 34.2%; pH/H₂O 7.6; EC: 416.5 μ S/cm and C:N 21.4.

The vermicomposting heap with household biowaste was set up on an area of 5.6 \times 25.5 m. Depth and the age of the layers were: V: 0–30 cm, < 3 months; IV: 30–60 cm, 3–6 months; III: 60–90 cm, 6–9 months; II: 90–120 cm, 9–12 months and I: 120–150 cm, > 12 months (Hanc et al., 2017) (Fig. 1).

The vermicomposting heap with malt house sludge was set up on an area of 6 \times 10 m. Depth and the age of layers were: V: 0–20 cm, < 3 months; IV: 20–40 cm, 3–6 months; III: 40–60 cm, 6–9 months; II: 60–80 cm, 9–12 months and I: 80–100 cm, > 12 months (Fig. 1).

The vermicomposting heap with grape marc was set up on an area of 2.5 \times 50 m. Depth and the age of layers were: V: 0–20 cm, < 3 months; IV: 20–40 cm, 3–6 months; III: 40–60 cm, 6–9 months; II: 60–80 cm, 9–12 months and I: 80–100 cm, > 12 months (Částkova and Hanč, 2019) (Fig. 1).

There were four samples from each layer collected at the end of the experiment. All earthworms were separated from samples, counted and weighed. The samples without earthworms were divided into three parts. The first part was dried at 35 °C to a constant weight for dry matter analysis and then ground. The second part was stored at 4 °C for pH determination and electrical conductivity (EC) analysis. The third part was frozen at –20 °C and then lyophilised for determination of microbial activity and enzymatic activity.

2.2. Agrochemical and biological analysis

The pH/H₂O and the EC were determined using a WTW pH 340 i (GeoTech, Denver, CO, USA) and WTW cond 730 (GeoTech, Denver, CO, USA), according to BSI EN 15933.

Earthworms were separated from the samples and counted manually. Afterwards, they were washed and weighed to determine biomass.

The groups of microorganisms were detected using phospholipid fatty acid (PLFA) analysis, according to Hanc et al. (2017).

The activity of β -D-glucosidase, acid phosphatase, arylsulphatase, lipase, chitinase, cellobiohydrolase, alanine aminopeptidase and leucine aminopeptidase were measured in 96-well microplates. Lyophilised vermicompost (0.2 g) was extracted using 20 mL of acetate buffer (pH 5.0, $c = 50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 1.39 g sodium acetate (CAS 127-09-3), 450 μ L acetic acid (CAS 64-19-7) and 500 mL demineralised water) in an Erlenmayer flask. The mixture was homogenised using an Ultra-Turrax (IKA Labor Technik, Staufen im Breisgau, Germany) for 30 s at 8000 rpm (Štursová and Baldrian, 2011). Individual enzyme activities (Table 1) were measured in four replicates for each sample. Homogenised samples (200 μ L) were pipetted into relevant wells in the microplate, and 40 μ L of the substrate was then added (Table 1). The microplate was placed in a Robbins Scientific® 2000 micro hybridisation incubator (SciGene, CA, USA) at 40 °C for 5 min. The fluorescence was then measured using a Tecan Infinite® M200 (Tecan Austria GmbH, Salzburg, Austria). The microplate was placed in the incubator again for 2 h, and the fluorescence was measured again according to Baldrian (2009). Methylumbelliferol (CAS 90-33-5) (1.0, 0.1 and

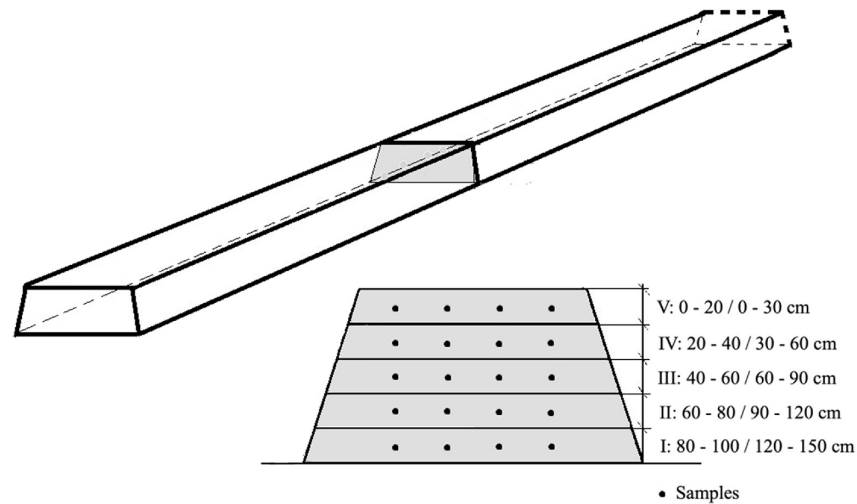


Fig. 1. Diagram of the vermicomposting heap. (The depths 0–100 cm are for the vermicomposting heap with sludge from malt house and for the heap with grape marc; 0–150 cm are for the vermicomposting heap with household biowaste.)

Table 1
Substrates used for the analysis of enzymatic activity.

Enzyme	Substrate	CAS No.	Concentration [mmol.L ⁻¹]
β -D-glucosidase	4-methylumbellyferyl- β -D-glucopyranoside (MUFG)	18997-57-4	2.75
acid phosphatase	4-methylumbellyferyl-phosphate (MUFP)	3368-04-5	2.75
arylsulphatase	4-methylumbellyferyl sulphate potassium salt (MUFS)	15220-11-8	2.50
lipase	4-methylumbellyferyl-caprylate (MUFY)	20671-66-3	2.50
chitinase	4-methylumbellyferyl-N-acetylglucosaminide (MUFN)	37067-30-4	1.00
cellobiohydrolase	4-methylumbellyferyl-N-cellobiopyranoside (MUFC)	72626-61-0	2.50
alanine aminopeptidase	L-alanine-7-amido-4-methylcoumarin (AMCA)	77471-41-1	2.50
leucine aminopeptidase	L-leucine-7-amido-4-methylcoumarin (AMCL)	66447-31-2	2.50

Dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) (CAS 67-68-5). All chemicals are from Sigma-Aldrich s.r.o., MO, USA.

0.01 mmol.L⁻¹) and 7-aminomethyl-4-coumarin (CAS 26093-31-2) (0.1 and 0.01 mmol.L⁻¹) were used for the calibration curve.

2.3. Statistical analysis

Results were presented as the mean values of four replicates. One-way ANOVA ($p \leq 0.05$; Tukey's HSD test), including testing for normality and homogeneity of data, was performed using STATISTICA 12 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Multiple regression and correlation analyses (0.05 level) were performed using IBM® SPSS Statistics 24® software (IBM, Armonk, NY, USA).

3. Results and discussion

Differences in dry matter content were found in the vermicomposting heap with household biowaste (Table 2), where the

lowest value was measured in layer IV and the highest in layer III. Dry matter was the lowest in layer I in the vermicomposting heap with malt house sludge (41.4%) (Table 3) and in the vermicomposting heap with grape marc (26.68%) (Table 4). This can be caused by the rainfall and the evaporation of water (Hanc et al., 2017). The problem with evaporation is also relevant to the vermicomposting heap with malt house sludge because there was lower dry matter content in layer V layer than in layer IV, but in this vermicomposting process there was no significant difference between the layers.

The pH value was mildly alkaline. In all vermicomposting processes, the statistical differences were found. In the vermicomposting process with sludge from malt house the pH value was lower with the age of the layers, except the oldest layer, but this layer consisted of different material. In the case of the other vermicomposting heaps, the pH values were very varied and ranged

Table 2
Selected parameters of vermicomposting heap with household biowaste.

Layer	Dry matter [%]	pH/H ₂ O	EC [μ S/cm]	Earthworms [pcs/kg]	Biomass of earthw. [g/kg]
V	40.16 \pm 2.19 ^a	8.70 \pm 0.13 ^b	1824 \pm 139.43 ^a	125 \pm 82	14.94 \pm 8.93
IV	34.95 \pm 1.64 ^c	8.75 \pm 0.07 ^b	2041 \pm 367.99 ^a	5 \pm 8	0.70 \pm 0.92
III	46.57 \pm 1.09 ^b	7.49 \pm 0.11 ^a	3640 \pm 318.01 ^b	3 \pm 4	0.29 \pm 0.42
II	43.76 \pm 0.69 ^b	8.11 \pm 0.09 ^c	2076 \pm 319.54 ^a	8 \pm 14	0.82 \pm 1.32
I	40.44 \pm 0.54 ^a	7.45 \pm 0.10 ^a	2317 \pm 197.88 ^a	0	0

Values are the means \pm SD (n = 4). Different letters (in superscript) in a column indicate significant differences (Tukey's HSD test, $P \leq 0.05$).

Table 3

Selected parameters of vermicomposting heap with mixture of malting sludge and agricultural waste.

Layer	Dry matter [%]	pH/H ₂ O	EC [μ S/cm]	Earthworms [pcs/kg]	Biomass of earthw. [g/kg]
V	42.30 \pm 4.88 ^a	8.82 \pm 0.15 ^b	1098 \pm 120.18 ^a	67.08 \pm 72.15	6.72 \pm 2.38
IV	46.13 \pm 4.80 ^a	8.80 \pm 0.10 ^b	1368 \pm 132.60 ^{ab}	4.17 \pm 4.19	1.28 \pm 0.53
III	45.00 \pm 3.02 ^a	8.57 \pm 0.10 ^{bc}	1131 \pm 254.00 ^a	0	0
II	43.51 \pm 3.76 ^a	8.18 \pm 0.08 ^a	1539 \pm 256.72 ^b	0	0
I	41.40 \pm 2.34 ^a	8.28 \pm 0.20 ^{ac}	1483 \pm 88.33 ^{ab}	0	0

Values are the means \pm SD (n = 4). Different letters (in superscript) in a column indicate significant differences (Tukey's HSD test, $P \leq 0.05$).**Table 4**

Selected parameters of vermicomposting heap with grape marc.

Layer	Dry matter [%]	pH/H ₂ O	EC [μ S/cm]	Earthworms [pcs/kg]	Biomass of earthw. [g/kg]
V	41.06 \pm 0.88 ^b	7.73 \pm 0.15 ^b	812 \pm 17.68 ^a	209 \pm 51	32.65 \pm 7.53
IV	39.20 \pm 0.85 ^{ab}	8.08 \pm 0.13 ^a	805 \pm 10.00 ^a	18 \pm 9	3.22 \pm 1.80
III	38.07 \pm 1.37 ^a	7.98 \pm 0.10 ^{ab}	729 \pm 31.98 ^{ab}	0	0
II	35.32 \pm 1.12 ^d	8.08 \pm 0.10 ^a	643 \pm 34.03 ^b	0	0
I	26.68 \pm 1.06 ^c	8.68 \pm 0.10 ^c	1433 \pm 131.75 ^c	0	0

Values are the means \pm SD (n = 4). Different letters (in superscript) in a column indicate significant differences (Tukey's HSD test, $P \leq 0.05$).

from 7.45 to 8.75. It was almost the same as showed Fernández-Gómez et al. (2011) in their vermicomposting experiment with winery waste (pH 8.3), olive-mill waste and biosolids (pH 7.4) or cattle manure (pH 7.5) after six months of vermicomposting in indoor continuous-flow reactor using *Eisenia fetida*.

The electrical conductivity decreases between layer V and layer I in all heaps. The highest EC (3640 μ S cm⁻¹) was measured in layer III in the vermicomposting heap with household biowaste. These layers were really varied in terms of EC values, because the composition of the layers depended on the season and the waste material from each apartment.

The highest number of earthworms (209 pcs. kg⁻¹) and the highest biomass of earthworms (32.65 g kg⁻¹) were found in the vermicomposting heap with grape marc (Table 4). The highest number and biomass of earthworms were found in the top layers where the EC was the lowest. Earthworms are sensitive to salt concentration, and the top layer also contained the highest percentage of organic matter, which serves as a food for earthworms (Gunadi et al., 2002).

In all layers, higher content of bacteria was measured than fungi. The highest ratio of bacteria/fungi was found in layer III in the heap with sludge from malt house (158.6), in which the highest activity of bacteria (61.7 μ g.g⁻¹dw) was also measured in layer V (Fig. 2a). This layer was not significantly different to other layers. In contrast, the lowest ratio was found in the top layer of the vermicomposting heap with grape marc (5.4); this layer also contained the highest content of fungi (11.3 μ g.g⁻¹dw; Fig. 2b). This layer was not significantly different to the other layers in the content of fungi. The vermicomposting heap with grape marc contained a concentration of fungi in all layers that was several times higher than it was in other vermicomposting heaps. Gómez-Brandón et al. (2011a) also reported nearly 100-fold higher activity of bacteria than fungi. The highest activity of these two microorganisms was in the nine-week-old layer of vermicompost from pig slurry using continuous feeding reactors and earthworms *E. fetida* (bacterial PLFAs 400 μ g.g⁻¹dw and fungal PLFAs 5 μ g.g⁻¹dw) (Gómez-Brandón et al., 2011a).

Activity of β -D-glucosidase showed approximately the same trend in the vermicomposting heap with household biowaste and in the heap with malt house sludge across the entire profile. The highest activity of β -D-glucosidase was measured during vermicomposting with grape marc (1642 μ mol MUFG. g⁻¹. h⁻¹ in layer II); the lowest activity was also measured in this vermicomposting

heap (429 μ mol MUFG. g⁻¹. h⁻¹ in layer IV) (Fig. 3a). This variability is caused by the high proportion of seeds, which the earthworms are unable to degrade. And the highest value in this variant can be caused by the value of the EC, which was the lowest in this layer. Mondini et al. (2004) reported that, in the case of composting cotton waste and composting cotton waste mixed with some yard waste, the activity of β -glucosidase increased with the age of compost. This activity decreased after 40 d of composting, increased after 80 d of composting and decreased again after 120 d and 180 d of composting the yard waste in their experiment. Also, Fernández-Gómez et al. (2010a) measured the activity of β -glucosidase in a vermicomposting experiment with continuous-feeding *E. fetida* with liquid-paste of tomato-fruit waste. The activity increased up to 6000 μ g p-nitrophenol. g⁻¹. h⁻¹ (90d) and, after that, decreased until the end of the experiment (210 d). So, the activities depend on the type of biowaste. Lazcano and Domínguez (2011) were interested in the effect of vermicompost on soil fertility and plant growth. They also dealt with enzyme content in soil after application of vermicompost, manure and conventional fertilizer. The experiment showed that the Glucosidase content was statistically significantly higher in the variant with vermicompost (120,000 μ g p-nitrophenol. g⁻¹. h⁻¹) than in the variant with conventional fertilizer (100,000 μ g p-nitrophenol. g⁻¹. h⁻¹).

Acid phosphatase activity in the vermicomposting heap with household biowaste showed a similar trend to β -D-glucosidase activity, but in the vermicomposting process with malting sludge, the acid phosphatase activity was almost constant throughout the process (Fig. 3b). A large significant difference was found between the youngest layer (layer V) and the other layers in terms of activity of acid phosphatase in the vermicomposting heap with grape marc. The highest activity was found in the youngest layer of this heap (2035 μ mol MUFP. g⁻¹. h⁻¹), and the lowest activity was in layer II of the vermicomposting heap with household biowaste (608 μ mol MUFP. g⁻¹. h⁻¹) (Fig. 3b). The highest activity in the layer V in the variant with grape marc can be caused by the highest content of bacteria and also fungi. Pramanik et al. (2007) analysed acid phosphatase activities of a few biowastes after 70–85 days of vermicomposting using *E. fetida*. They tested cow dung, grass, aquatic weeds and municipal solid waste. The highest activity after 70–85 days of vermicomposting was found in vermicompost from cow dung (approximately 180,000 μ g p-nitrophenol. g⁻¹. h⁻¹), and the lowest activity was measured in the variant from municipal solid waste (approximately 120,000 μ g p-nitrophenol. g⁻¹. h⁻¹). Acid

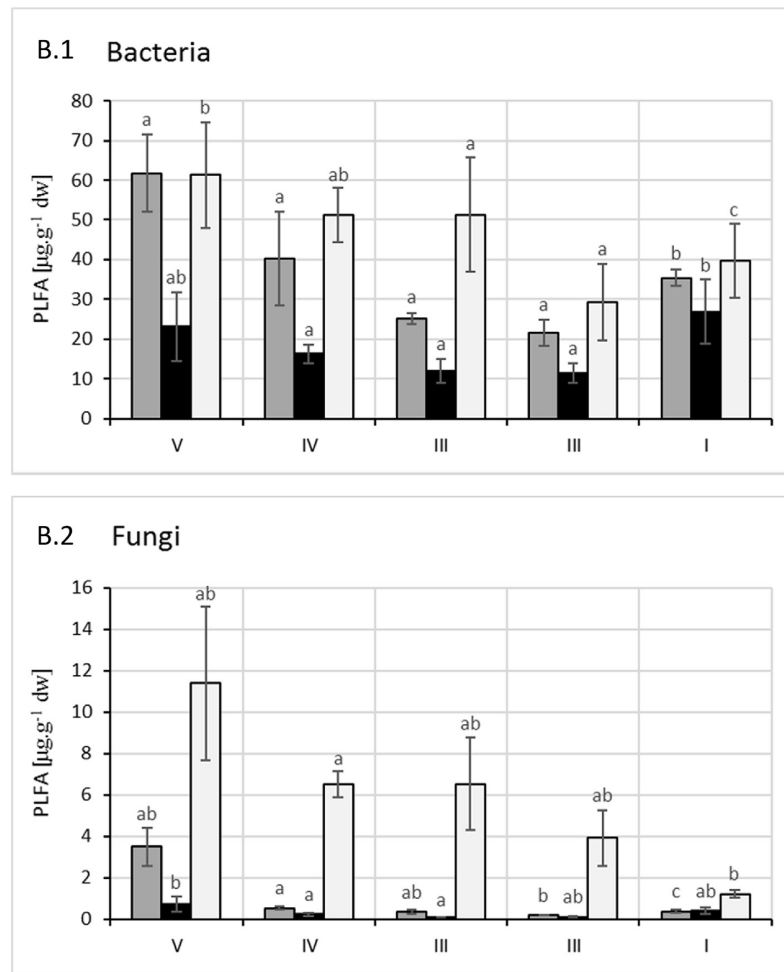


Fig. 2. Activity of bacteria (a) and fungi (v) in all layers of vermicomposting heaps. Values are the means \pm SD ($n = 4$). Different letters indicate significant differences (Tukey's HSD test, $P \leq 0.05$). Legend: Vermicomposting heap with \blacksquare Household biowaste; \blacksquare Malting sludge; \square Grape marc.

phosphatase activity reported in the experiment of [Mondini et al. \(2004\)](#) differed according to the type of biowaste. The experiment involved composting of organic residues (cotton waste, yard waste and a mixture of these two) in perforated plastic boxes placed outdoors under a roof for 149 days. The highest activity they measured in compost from the mixture of cotton waste and yard waste (approximately $8500 \mu\text{g p-nitrophenol. g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) after 40 days of composting, and the lowest activity was found at the start of experiment in compost from cotton waste (approximately $2000 \mu\text{g p-nitrophenol. g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Several studies looked at the application of vermicompost to soil and its effect on enzymes in relation to soil fertility. [Lazcano and Domínguez \(2011\)](#) found that the vermicompost fertilized variant had a higher phosphatase content (about $160,000 \mu\text{g p-nitrophenol. g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) than the variant with conventional fertilizer (about $140,000 \mu\text{g p-nitrophenol. g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Also, in the experiment done by [Marinari et al. \(2000\)](#) and [Saha et al. \(2008\)](#), there was a statistically significant increase in acid phosphatase content after application of vermicompost to the soil. The application of vermicompost to the soil is useful due to its effect on the transformation of organic phosphorus, which is important for

the favorable environment for microbes and plant roots ([Saha et al., 2008](#)).

With regard to arylsulphatase activity in our experiment, it could be said that the trend across the profile of vermicomposting heap with household biowaste and with malting sludge is similar. However, the decline in activity of arylsulphatase was already in layer II in the vermicomposting heap with household biowaste and in the heap with malting sludge was the decline up to layer III. Arylsulphatase activity was very low throughout the process with all vermicomposting biowastes and values ranged from $13 \mu\text{mol MUFS. g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (layer I, grape marc) to $66 \mu\text{mol MUFS. g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (layer V, household biowaste) ([Fig. 3c](#)). There were no significant differences between each layer of all vermicomposting heaps. [Mondini et al. \(2004\)](#) also analysed the activity of arylsulphatase. This activity of arylsulphatase was many times lower than the activities of other enzymes (β -glucosidase, acid phosphatase and alkaline phosphatase), but it increased to day 120 and then decreased to day 160. Arylsulphatase activity was also measured by [Růžek et al. \(2015\)](#) in an experiment with green waste compost (green municipal waste, white high-moor peat, clayey soil and

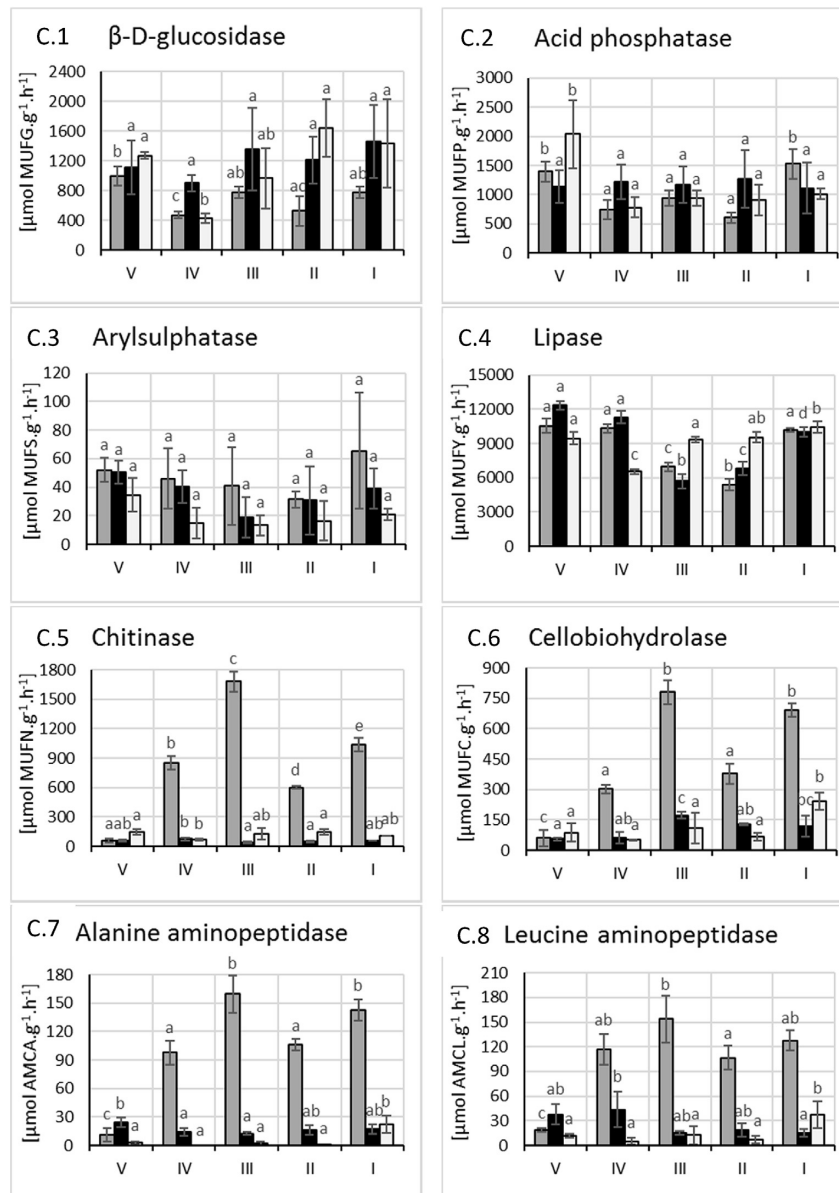


Fig. 3. Enzymatic activity in all layers of vermicomposting heaps. Values are the means \pm SD ($n = 4$). Different letters indicate significant differences (Tukey's HSD test, $P \leq 0.05$). Legend: ■ Household biowaste; ■ Malting sludge; □ Grape marc.

perlite). They measured the activity in the control variant (fresh compost) and three times during storage of the compost (7–14 d; 15–20 d; 21–147 d). The highest activity they measured after 15–20 days of storage ($520 \text{ mg p-nitrophenol. h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$) and the lowest activity they found was in the control variant ($292 \text{ mg p-nitrophenol. h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$). Tejada et al. (2010) investigated the effect of vermicompost from cow manure and green forage on soil properties. They found, after comparing these two variants, that vermicompost from cow dung has a better effect on soil properties due to the more labile fractions of organic matter. For arylsulphatase, the

values were 14.2% higher in the variant with cow manure than in the variant with green forage.

With regard to lipase activity, the vermicomposting process with grape marc showed a trend that was the inverse of that with other vermicomposting processes. Lipase activity was very high in all vermicomposting heaps, ranging from $5382 \text{ μmol MUFY. g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ to $12,341 \text{ μmol MUFY. g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Fig. 3d). The lowest value was found in the vermicomposting heap with household biowaste (layer II) and the highest value was found in the heap with malting sludge (layer V), where was also the highest pH value from every variants

and layers (8,82).

Chitinase is mainly produced by fungi, which were the most active during the vermicomposting process with grape marc, but the highest activity of this enzyme was many times higher in the vermicomposting heap with household biowaste than in others (Fig. 3e). In the case of the heap containing malting sludge, the chitinase values were very low, but there were some significant differences between the layers. The lowest values in the variant with malting sludge can be caused by the lowest values of bacteria and also fungi, which mainly produce the chitinase. Chitinase activity can be suppressed by its products such as glucose and N-acetylglucosamine (Gooday, 1994). The chitinase activity measured by Lee et al. (2016) during their composting process of a mixture of biowaste (pig and chicken manure, spent mushroom, sawdust, rice hull and addition of fertilizers contain Mo, Zn, B, Mn and Cu) decreased with the age of the compost and it ranged from $400 \mu\text{g g}^{-1}$ (after 90 d of composting) to $550 \mu\text{g g}^{-1}$ (at the beginning of composting).

The highest activity of cellobiohydrolase was in the vermicomposting heap with household biowaste (Fig. 3f). The level of enzymatic activity of cellobiohydrolase across the entire profile has the same trend as chitinase in the case of heap with household biowaste. The high values in household biowaste may be caused by the wide variety of constituent materials. And the highest value in layer III, can be caused by the highest value of EC.

Activity of alanine aminopeptidase was the lowest during the vermicomposting process with grape marc, where in several layers zero activity was even recorded (Fig. 3g). The highest value was measured in the vermicomposting heap with household biowaste (layer III), where was also the highest value of electrical conductivity.

With regard to leucine aminopeptidase, the highest values were $154 \mu\text{mol AMCL. g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for the vermicomposting heap with household biowaste (layer III), $44 \mu\text{mol AMCL. g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for the vermicomposting heap with malting sludge (layer IV) and only $38 \mu\text{mol AMCL. g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for the heap with grape marc (layer I) (Fig. 3h). The highest activity in the variant with household biowaste can be caused by the highest value of electrical conductivity in this layer (layer III).

Correlation and multiple regression analysis of the effect of microorganisms (fungi and bacteria) and earthworms on the individual enzymes were performed. Based on the dependence course (Eq. A), supplemented by the correlation analysis, it can be stated that the activity of β -D-glucosidase is significantly influenced by activity of fungi and bacteria, and also by the number of earthworms. The activity of β -D-glucosidase will be higher if more fungi and earthworms are present in vermicomposting process. In contrast, the indirect dependence was found between β -D-glucosidase and bacterial activity.

$$y = 667.063 + 122.294x_1 - 2.459x_2 + 0.39x_3$$

Eq. A: The course of β -D-glucosidase activity (y) on fungal (x_1) and bacterial (x_2) activity and on number of earthworms (x_3) in the vermicomposting process with household biowaste. R square is 44.8%.

In the cases of the vermicomposting process with malting sludge and agricultural waste and the vermicomposting process with grape marc, the activity of β -D-glucosidase also appears to be influenced by all selected biological parameters (fungal and bacterial activity and the number of earthworms) (Eq. B, Eq. C). In both processes, increased activity of β -D-glucosidase occurred when there was also increased activity of fungi and the number of earthworms. The activity of β -D-glucosidase decreases when bacterial activity increases (assuming fungal activity and the number of

earthworms is constant).

$$y = 800.219 + 2.359x_1 + 26.153x_2 - 5.05x_3$$

Eq. B: The course of the β -D-glucosidase activity (y) on fungal (x_1) and bacterial (x_2) activity and on number of earthworms (x_3) in the vermicomposting process with sludge from malt house and agricultural waste. R square is 33.3%.

$$y = 2282.787 + 16.171x_1 - 28.747x_2 + 2.349x_3$$

Eq. C: The course of the β -D-glucosidase activity (y) on fungal (x_1) and bacterial (x_2) activity and on number of earthworms (x_3) in the vermicomposting process with grape marc. R square is 39.3%.

Based on the other dependence courses (other equations) and the correlation analysis, it is clear that the activity of acid phosphatase is positively influenced by the activity of bacteria and fungi in the vermicomposting heap with household biowaste, and by the earthworms during vermicomposting of grape marc, marked significant dependence was reported. In the case of arylsulphatase activity, very low R square indexes were found in all vermicomposting heaps. Only in the heap containing grape marc did the earthworms show statistically significant direct dependence. The activity of lipase was very highly influenced by bacterial activity during the vermicomposting process of household biowaste and by fungal activity during the process of vermicomposting of a mixture of malting sludge and agricultural waste. No statistically significant dependencies were found in the vermicomposting heap with grape marc. The activity of chitinase was negatively influenced by all parameters in the vermicomposting heap with household biowaste, but in the case of vermicomposting with malting sludge, direct dependence was found between the activity of chitinase and the number of earthworms. Activity of fungi had a significant negative effect on cellobiohydrolase activity in the case of vermicomposting of household biowaste or mixture with malting sludge. In the case of vermicomposting grape marc, only weak dependencies were found. Activity of alanine aminopeptidase was very highly influenced by the activity of fungi in all vermicomposting heaps, but only in the case of vermicomposting the mixture of malting sludge was the dependence direct. Also, the activity of leucine aminopeptidase was influenced by activity of fungi, but only during the vermicomposting of household biowaste and the mixture with malting sludge. In the case of vermicomposting of household biowaste, dependencies were found between all biological parameters and the activity of leucine aminopeptidase. The vermicomposting heap with grape marc showed no statistically significant dependencies.

4. Conclusions

The highest activity of all measured enzymes occurred in the vermicomposting process with household biowaste. The highest contents of β -D-glucosidase ($994\text{--}1272 \mu\text{mol MUFG. g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), acid phosphatase ($1139\text{--}2036 \mu\text{mol MUFG. g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), arylsulphatase ($35\text{--}52 \mu\text{mol MUFS. g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) and lipase ($9466\text{--}12341 \mu\text{mol MUFY. g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) were found in the youngest layers. On the other hand, the highest activities of chitinase ($1681 \mu\text{mol MUFN. g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), cellobiohydrolase ($782 \mu\text{mol MUFC. g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), alanine ($160 \mu\text{mol AMCA. g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) and leucine aminopeptidase ($154 \mu\text{mol AMCL. g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) were significantly higher in the vermicomposting heap with household biowaste. The enzyme values show that the most active vermicomposted material was the household biowaste, due to the heterogeneity of organic waste. Therefore, this waste appears to be most suitable for soil application. Vermicompost from domestic biowaste should best facilitate the rapid decomposition of organic

compounds into forms acceptable to plants, due to the high enzymatic activity. The least active was malt house sludge. Even so, it can be concluded that the activity of the enzymes was sufficient throughout the process and that the vermicomposting process proceeded correctly in all variants. Based on the dependence courses that were found, some enzymes are positively influenced by the number of earthworms. However, this model is only theoretical and the question of its functionality in practice should be considered. This information is in demand by people interested in vermicomposting and is useable in practice.

A well-run system of vermicomposting household biowaste, malt house sludge and grape marc in site is almost maintenance-free, low-cost and ecological, thus contributing to cleaner production.

Acknowledgements

This study was supported under the NAZV project No. QK1910095, CIGA project No. 20172018, and the FAFNR S-Grant 21140/1312/3132. The authors would like to thank Proof-Reading-Service.com for professionally proofread of the English text.

References

- Abbasi, S.A., Nayeem-Shah, M., Abbasi, T., 2015. Vermicomposting of phytomass: limitations of the past approaches and the emerging directions. *J. Clean. Prod.* 93, 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.01.024>.
- Atiyeh, R.M., Subler, S., Edwards, C.A., Bachman, G., Metzger, J.D., Shuster, W., 2000. Effect of vermicomposts and composts on plant growth in horticultural container media and soil. *Pedobiologia* 44, 579–590. [https://doi.org/10.1078/S0031-4056\(04\)70073-6](https://doi.org/10.1078/S0031-4056(04)70073-6).
- Baldrian, P., 2009. Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. *Plant Soil Environ.* 55, 370–378.
- Björklund, A., Bjugger, C., Dalemo, M., Sonesson, U., 1999. Planning biodegradable waste management in Stockholm. *J. Ind. Ecol.* 3, 43–58. <https://doi.org/10.1162/108819899569683>.
- Brenda, 2019. Enzyme database. The comprehensive enzyme information system. <http://www.brenda-enzymes.info/> (accessed January 2019).
- Častková, T., Hanc, A., 2019. Change of the parameters of layers in a large-scale grape marc vermicomposting system with continuous feeding. *Waste Manag. Res.* 37, 826–832. <https://doi.org/10.1177/0734242X18819276>.
- Domínguez, J., Martínez-Corderio, H., Álvarez-Casas, M., Lores, M., 2014. Vermicomposting grape marc yields high quality organic bio-fertiliser and bioactive polyphenols. *Waste Manag. Res.* 32, 1235–1240. <https://doi.org/10.1177/0734242X14555805>.
- Enowashu, E., Kandeler, E., Lamesdorf, N., Poll, C., 2009. Microbial biomass and enzyme activities under reduced nitrogen deposition on a spruce forest soil. *Appl. Soil Ecol.* 43, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.05.003>.
- Faaij, A., 2006. Modern biomass conversion technologies. *Mitig. Adapt. Strategies Glob. Change* 11, 343–375. <https://doi.org/10.1007/s11027-005-9004-7>.
- Fernández-Gómez, M.J., Nogales, R., Insam, H., Romero, E., Goberna, M., 2010a. Continuous-feeding vermicomposting as a recycling management method to revalue tomato-fruit wastes from greenhouse crops. *Waste Manag.* 30, 2461–2468. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2010.07.005>.
- Fernández-Gómez, M.J., Romero, E., Nogales, R., 2010b. Feasibility of vermicomposting for vegetable greenhouse waste recycling. *Bioresour. Technol.* 101, 9654–9660. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.109>.
- Fernández-Gómez, M.J., Nogales, R., Insam, H., Romero, E., Goberna, M., 2011. Role of vermicompost chemical composition, microbial functional diversity, and fungal community structure in their microbial respiratory response to three pesticides. *Bioresour. Technol.* 102, 9638–9645. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.113>.
- Flavel, T.C., Murphy, D.V., Lalor, B.M., Fillery, I.R.P., 2005. Gross N mineralization rates after application of composted grape marc to soil. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1397–1400. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.12.003>.
- Gaddie Sr., R.E., Douglas, D.E., 1975. *Earthworms for Ecology and Profit*. Scientific Earthworm Farming. Bookworm Publishing Company, California, ISBN 0916302059.
- Goody, G.W., 1994. *Physiology and microbial degradation of chitin and chitosan*. In: Ratledge, C. (Ed.), *Biochemistry of Microbial Degradation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, ISBN 978-94-011-1687-9, pp. 279–312.
- Gómez-Brandón, M., Aria, M., Loreas, M., Domínguez, J., 2011a. Changes in microbial community structure and function during vermicomposting of pig slurry. *Bioresour. Technol.* 102, 4171–4178. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.057>.
- Gómez-Brandón, M., Lazcano, C., Lores, M., Domínguez, J., 2011b. Short-term stabilization of grape marc through earthworms. *J. Hazard Mater.* 187, 291–295. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.01.011>.
- Gunadi, B., Blount, C., Edward, C.A., 2002. The growth and fecundity of *Eisenia fetida* (Savigny) in cattle solids pre-composted for different periods. *Pedobiologia* 46, 15–23.
- Hanc, A., Castkova, T., Kuzel, S., Cajthaml, T., 2017. Dynamics of a vertical-flow windrow vermicomposting system. *Waste Manag. Res.* 11, 1121–1128. <https://doi.org/10.1177/0734242X17725161>.
- Hanc, A., Novak, P., Dvorak, M., Habart, J., Svehla, P., 2011. Composition and parameters of household bio-waste in four seasons. *Waste Manag.* 31, 1450–1460. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.02.016>.
- Lazcano, C., Domínguez, J., 2011. *The Use of Vermicompost in Suitable Agriculture: Impact on Plant Growth and Soil Fertility*. Nova Science Publishers, Inc., New York, ISBN 978-1-61324-785-3.
- Lee, Y.S., Choi, S.Y., Lee, J.O., Kang, J.H., Kim, K.Y., 2016. Comparative assessment of enzyme activities and characteristics during composting of two types of composts. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 47, 1845–1855. <https://doi.org/10.1080/00103624.2016.1194992>.
- Marinari, S., Masciandaro, G., Ceccanti, B., Grego, S., 2000. Influence of organic and mineral fertilisers on soil biological and physical properties. *Bioresour. Technol.* 72, 9–17. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00094-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00094-2).
- Mc Lean, M.A., Parkinson, D., 1998. Impacts of the epigeic earthworm *Dendrobaena octaedra* on oribatid mite community diversity and microarthropod abundances in pine forest floor: a mesocosm study. *Appl. Soil Ecol.* 7, 125–136. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(97\)00041-3](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(97)00041-3).
- Mertz, B., Hill, A.D., Mulakala, C., Reilly, P.J., 2007. Automated docking to explore substrate binding by glycoside hydrolase family 6 cellobiohydrolases and endoglucanases. *Biopolymers* 87, 249–260. <https://doi.org/10.1002/bip.20831>.
- Mondini, C., Fornaiser, F., Sinicco, T., 2004. Enzymatic activity as a parameter for the characterization of the composting process. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1587–1594. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.008>.
- Nogales, R., Cifuentes, C., Benítez, E., 2005. Vermicomposting of winery wastes: A laboratory study. *J. Environ. Sci. Health Part B* 40, 659–673. <https://doi.org/10.1081/PFC-200061595>.
- Pramanik, P., Ghosh, G.K., Ghosal, P.K., Banik, P., 2007. Changes in organic-C, N, P and K and enzyme activities in vermicompost of biodegradable organic wastes under liming and microbial inoculants. *Bioresour. Technol.* 98, 2485–2494. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.017>.
- Romero, E., Fernández-Bayo, J., Díaz, J.M.C., Nogales, R., 2010. Enzyme activities and diuron persistence in soil amended with vermicompost derived from spent grape marc and treated with urea. *Appl. Soil Ecol.* 44, 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.12.006>.
- Růžek, L., Růžková, M., Koudela, M., Becková, L., Becka, D., Krulíš, Z., Šárka, E., Voríšek, K., Ledvína, S., Salamounová, B., Venyercsanová, J., 2015. Biodegradation of composites based on maltodextrin and wheat B-starch in compost. *Hortic. Sci. (HORTSCI)* 42, 209–214. <https://doi.org/10.17221/219/2014-HORTSCI>.
- Saha, S., Mina, B.L., Gopinath, K.A., Kundu, S., Gupta, H.S., 2008. Relative changes in phosphatase activities as influenced by source and application rate of organic composts in field crops. *Bioresour. Technol.* 99, 1750–1757. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.03.049>.
- Sinha, R.K., Nair, J., Bharambe, G., Patil, S., Bapat, P., 2008. Vermiculture revolution: a low-cost and sustainable technology for management of municipal and industrial organic wastes (solid and liquid) by earthworms with significantly low greenhouse gas emissions. In: Daven, J.L., Klein, R.N. (Eds.), *Progress in Waste Management Research*. Nova Science Publishers, New York, ISBN 978-1-60456-235-4, pp. 159–227.
- Sinha, R.K., Agarwal, S., Chauhan, K., Chandran, V., Soni, B.K., 2010. Vermiculture Technology: reviving the dreams of Sir Charles Darwin for scientific use of earthworms in sustainable development programs. *Technol. Invest.* 1, 155–172.
- Štursová, M., Baldrian, P., 2011. Effects of soil properties and management on the activity of soil organic matter transforming enzymes and the quantification of soil-bound and free activity. *Plant Soil* 338, 99–110. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0296-3>.
- Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1970. Factors affecting soil arylsulfatase activity. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 34, 427–429. <https://doi.org/10.2136/sssaj1970.03615995003400030023x>.
- Tejada, M., Gómez, I., Hernández, T., García, C., 2010. Utilization of vermicomposts in soil restoration: effects on soil biological properties. *Soil Biol. Biochem.* 42, 525–532. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.02.060>.
- Wickström, M., Larsson, R., Nygren, P., Gullbo, J., 2011. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Sci.* 102, 501–508. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01826.x>.

6. Sumární diskuse

Největší statisticky významné rozdíly byly nalezeny v obsahu sušiny u vermikompostovací zakládky s biologicky rozložitelným odpadem (BRKO), kde byla naměřena nejnižší hodnota ve vrstvě IV (35 %) a nejvyšší ve vrstvě III (47 %). Celkově nejnižší hodnota sušiny byla ve vrstvě IV vermikompostovací zakládky s lihovarskými výpalky (15 %) a ve vermikompostovací zakládce s matolinou (27 %). Nižší hodnoty sušiny mohou být způsobeny srážkami nedávno před odběrem vzorků. Vyšší hodnoty sušiny v horních vrstvách, pak průsakem vody do nižších vrstev a podloží či odpařováním vody. Problém s odpařováním byl pravděpodobně důvodem vyšší hodnoty sušiny ve vrstvě V vermikompostovací zakládky s BRKO, neboť ve vrstvě V byl naměřen statisticky významně nižší obsah sušiny než ve vrstvě IV.

Hodnota pH se pohybovala u všech vermikompostovacích zakládek v neutrální až mírně alkalické oblasti. U všech vermikompostovacích zakládek byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi vrstvami. U vermikompostování kalu ze sladovny se hodnota pH snižovala spolu se stářím vrstev, s výjimkou nejstarší vrstvy, tato vrstva ovšem obsahovala i příměs jiného materiálu z násady s žížalami. U vermikompostovací zakládky s lihovarskými výpalky se pH naopak zvyšovalo se stářím vrstev. V případě ostatních vermikompostovacích zakládek byly hodnoty pH velmi různorodé, pohybovaly se v rozmezí od 7,45 do 8,75. Což bylo téměř totožné s pokusem Fernández-Gómeze et al. (2011), kteří vermikompostovali odpad ze zpracování vinné révy, odpad ze zpracování oliv nebo hnůj skotu, po dobu šesti měsíců, ve vermikompostovacím reaktoru s průběžným kmením, za použití žížal *E. fetida*. Hodnota pH výsledného vermikompostu se pohybovala v rozmezí od 7,4 (u odpadu po zpracování oliv) do 8,3 (u odpadu ze zpracování vinné révy). Singh et al. (2005) vermikompostovali rostlinné zbytky, které měly počáteční hodnotu pH mezi 4,3 – 6,9. Po 30 dnech vermikompostování došlo ke zvýšení hodnoty pH na neutrální hodnotu. Rostoucí hodnota pH během procesu vermikompostování může být také dle Romera et al. (2007) způsobena tvorbou alkalických meziproduktů při rozkladu organických kyselin za působení mikroorganismů.

Měrná vodivost klesala napříč profilem (od nejmladší po nejstarší vrstvu) pouze u vermikompostovací zakládky s lihovarskými výpalky. U vermikompostovací zakládky s matolinou došlo k poklesu mezi V. a II. vrstvou, u vrstvy I (nejstarší vrstvy) byla měrná vodivost vyšší, což mohlo být způsobeno příměsí jiného bioodpadu z násady žížal. Nejvyšší měrná vodivost ($3\,640\ \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) byla naměřena ve vrstvě III vermikompostovací zakládky s BRKO. Vrstvy této vermikompostovací zakládky se od sebe značně lišily, neboť se

složení vrstev odvíjelo od ročního období a odpadního materiálu z každé domácnosti. Hanč a Plíva (2012) vermikompostovali zahradní bioodpad v laboratorních podmínkách v systému jednorázového krmení žížal *E. andrei*. Výluh, uvolňovaný během procesu, byl zachycován a vrácen zpět do vermikompostovaného materiálu. Počáteční hodnota měrné vodivosti byla cca 2 000 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, po jednom měsíci vermikompostování se měrná vodivost zvýšila na 3 000 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ a pohybovala se kolem této hodnoty po dobu dalších 4 měsíců.

Celkový obsah uhlíku, dusíku a jejich poměr byl stanoven u vermikompostovací zakládky s BRKO, lihovarskými výpalky a matolinou. Nejvyšší celkový obsah uhlíku byl naměřen u vermikompostovací zakládky s matolinou, kde se hodnoty pohybovaly od 37 % ve vrstvě I do 46,5 % ve vrstvě V. Nejnižší hodnotu vykazovala vrstva II vermikompostovací zakládky s BRKO (17,2 %). U všech vermikompostovacích zakládek klesal obsah uhlíku s hloubkou profilu zakládky. Yadav a Garg (2011) vermikompostovali kravský hnůj, drůbeží trus a kal z potravinářského průmyslu v různých poměrech po dobu 13 týdnů v laboratorních podmínkách za využití žížal *E. fetida*. Hodnota uhlíku se v jejich experimentu pohybovala po 13 týdnech vermikompostování v rozmezí 30 až 38 % (300 000 – 380 000 mg/kg). Hidayati et al. (2017) vermikompostovali odpad po pěstování hub, kravský hnůj, zbytky zeleniny, kokosové slupky a rostlinné stelivo. Celkový obsah uhlíku se během vermikompostování pohyboval v rozmezí 22 – 27 % (220 000 – 270 000 mg/kg). Celkový obsah dusíku byl u vermikompostovací zakládky s lihovarskými výpalky a matolinou až o jednotku procenta vyšší než u vermikompostovací zakládky s BRKO. Ve vermikompostovacích zakládkách s matolinou a lihovarskými výpalky se obsah celkového N pohyboval v rozmezí 2,1 – 2,6 % u matoliny, a 2,3 – 2,7 % u lihovarských výpalků. U vermikompostovací zakládky s BRKO bylo rozmezí hodnot mezi 1,5 – 1,8 %. Nejvyšší poměr C:N byl u vermikompostovací zakládky s matolinou, kde byla nejvyšší hodnota 22,3 u nejmladší vrstvy (vrstva V) a nejnižší pak u vrstvy nejstarší (vrstva I) 14,2. U vermikompostovacích zakládek s lihovarskými výpalky a s BRKO byly hodnoty C:N nižší. Hodnota nejmladší vrstvy u vermikompostovací zakládky s BRKO byla 16,1 a klesala se stářím vrstev až na hodnotu 10,3. I přes nízkou hodnotu ve vrstvě V byl právě v této vrstvě (zakládky s BRKO a s matolinou) napočítán nejvyšší počet žížal ze všech vermikompostovacích zakládek. U vermikompostovací zakládky s lihovarskými výpalky se hodnoty C:N pohybovaly v rozmezí 15,3 (vrstva IV) – 10,9 (vrstva I). Dle Garga a Gupty (2009) se při dosažení poměru C:N 20:1 a nižší, ve finální fázi vermikompostování, jedná již o stabilizovaný organický odpad – tedy stabilní vermikompost. Námi vypočtený poměr C:N byl ve finální fázi nižší než 20:1 a u dvou vermikompostovacích zakládek byl nižší dokonce i u nejmladších vrstev.

Významné zvýšení obsahu dusíku může být způsobeno snížením obsahu organických látek a uvolňováním dusíku během procesu mineralizace, případně promýváním živin z profilu. Dalším možným důvodem je větší obsah mikroorganismů vázajících dusík, neboť anaerobní proces (ke kterému dochází ve spodních vrstvách, kde žížaly již nejsou aktivní) podporuje fixaci dusíku (Ferrer et al. 2001). V pokusu s vermikompostováním matoliny Domíngueze et al. (2014) byla hodnota zralého vermikompostu také dost nízká 12,7:1, při počátečním poměru C:N pouze 24:1, což je velmi podobné našim hodnotám při vermikompostování matoliny. Při procesu kompostování směsi odpadu z vinařství, lihovaru a hnoje, prováděného Torres-Climent et al. (2015), došlo také k poklesu poměru C:N na nižší hodnotu než 20:1 a to z 21,9:1 na 13,5:1.

Formy minerálního dusíku (N-NH_4^+ a N-NO_3^-) hrají významnou roli při využití vermikompostu jako hnojiva. Během procesu vermikompostování urychlují žížaly svou aktivitou mineralizaci dusíku, takže se dusík ve vermikompostech pohybuje především ve formě dusičnanů (Atiyeh et al. 2000a). Žížaly uvolňují během vermikompostovacího procesu do materiálu kromě hlenu také dusíkaté látky, hormony stimulující růst rostlin a enzymy obsahující různé formy dusíku (Garg & Gupta 2009). Nejvyšší hodnota N-NH_4^+ byla naměřena v nejstarší vrstvě (vrstva I) vermikompostovací zakládky s lihovarskými výpalky, kde dosáhla velmi vysoké hodnoty 162 mg/kg. Naopak nejnižší hodnota byla naměřena ve vrstvě III vermikompostovací zakládky s matolinou (17 mg/kg). Hodnoty N-NH_4^+ se v jednotlivých vrstvách vermikompostovacích zakládek (s BRKO, lihovarskými výpalky a matolinou) velmi lišily. Nelze tedy jednoznačně říci, že by hodnoty klesaly nebo stoupaly se stářím vrstev. Dle Thompsona et al. (2003) by měla být hodnota N-NH_4^+ pro zralý kompost nižší než 75 mg/kg, které dosáhly pouze vrstvy vermikompostovací zakládky s BRKO a s matolinou. Poměr $\text{N-NH}_4^+ / \text{N-NO}_3^-$ byl stanovován pouze u vermikompostovací zakládky s BRKO a s matolinou. Nejvyšší (12,99 – vrstva V) i nejnižší hodnota (0,03 – vrstva III) byla nalezena ve vermikompostovací zakládce s BRKO. Hodnoty $\text{N-NH}_4^+ / \text{N-NO}_3^-$ se u vermikompostovací zakládky s matolinou pohybovaly v rozmezí od 0,11 u vrstvy I do 0,45 u vrstvy IV. Dostupný organický uhlík (DOC) byl měřen u vermikompostovací zakládky s BRKO, lihovarskými výpalky a matolinou. Zmora-Nahum et al. (2005) určili hodnotu 4 000 mg/kg DOC jako maximální hodnotu označující zralost kompostu. Nicméně Hue a Liu (1995) doporučili vyšší hodnotu a to max. 10 000 mg/kg. Nejvyšších hodnot dosahoval DOC ve vermikompostovací zakládce s matolinou, kde se hodnoty pohybovaly mezi 9 065 mg/kg (vrstva I) – 13 559 mg/kg (vrstva V). Naopak nejnižších hodnot dosahovala vermikompostovací zakládka s BRKO s hodnotami mezi 4 581 mg/kg (vrstva I) – 7 984 mg/kg (vrstva IV). Nejstarší vrstvy všech vermikompostovacích zakládek by tak vyhověly pouze hodnotě pro zralý

kompost určené Huem a Liuem (1995). Gómez-Brandón et al. (2011b) vermikompostovali matolinu v laboratorních podmínkách v plastových nádobách v systému jednorázového krmení po dobu 15 dnů za použití žížal *E. andrei*. Hodnota jimi změřeného DOC činila 4100 mg/kg, což je méně než nejnižší hodnoty v našich vermikompostovacích zakládkách. Jejich hodnota pro N-NO_3^- byla 80 mg/kg a hodnota N-NH_4^+ 190 mg/kg po 15 dnech vermikompostování, poměr $\text{N-NH}_4^+ / \text{N-NO}_3^-$ tak činil 2,4:1. Jejich hodnota N-NH_4^+ byla téměř o 30 mg/kg vyšší než námi naměřená nejvyšší hodnota N-NH_4^+ .

Ionto-výměnná kapacita (IEC) a její poměr k celkovému uhlíku byly měřeny u vermikompostovací zakládky s BRKO, lihovarskými výpalky a matolinou. Hodnoty IEC se u všech vermikompostovacích zakládek pohybovaly v téměř stejném rozmezí 50 – 64 mmol $_+$ /100g. Hodnoty vermikompostovacích zakládek byly vyšší než hodnoty uvedené ve studii Váchalové et al. (2014), pro vzorky půdy (2,1–23,4 mmol $_+$ /100g), rašelinu (28,8 mmol $_+$ /100g) a zahradní kompost (35,2 mmol $_+$ /100g), ale nižší než hodnoty pro syntetický katex (měnič kationtů) (90,5 mmol $_+$ /100g). Nejvyšší poměr IEC / C_{tot} byl zjištěn u vermikompostovací zakládky s BRKO, v rozmezí 2,44 (vrstva IV) – 3,56 (vrstva II). Naopak nejnižší hodnoty vykazovala vermikompostovací zakládka s matolinou 1,25 (vrstva V) – 1,49 (vrstva II).

Nejvyšší počet žížal (209 ks.kg $^{-1}$) a nejvyšší biomasa žížal (32,65 g.kg $^{-1}$) byly zjištěny ve vermikompostovací zakládce s matolinou. Nejvyšší počet a biomasa žížal byly vždy nalezeny v horních (nejmladších) vrstvách, kde byla také nejnižší EC. Žížaly jsou citlivé na vyšší koncentraci solí. Horní vrstvy také obsahovaly nejvyšší procento organické hmoty, která slouží jako potrava pro žížaly (Gunadi et al. 2002). Dle Arthura et al. (2012) ovlivňují žížaly množství živin přístupných pro rostliny. Tyto živiny mohou být akumulovány žížalami, čímž se snižuje jejich mobilita (Pan & Wang 2009). Současně však žížaly vylučují a zpřístupňují určité množství dostupných živin (Shipitalo & Protz 1989). Proto byly u vermikompostovací zakládky s BRKO, lihovarskými výpalky a matolinou analyzovány obsahy makroprvků v samotných žížalách. Nejvyšší obsahy P (9 136 mg/kg vrstva IV) a K (10 103 mg/kg vrstva IV) byly naměřeny v žížalách z vermikompostovací zakládky s matolinou. Nejvyšší hodnota Mg (2 186 mg/kg vrstva II) však byla naměřena v žížalách z vermikompostovací zakládky s lihovarskými výpalky, kde byl také nejnižší počet i biomasa žížal, pravděpodobně díky velmi nízkému pH samotných lihovarských výpalků (4,9). Naopak nejvyšší hodnoty všech sledovaných prvků u žížal z vermikompostování BRKO (P: 7 438 mg/kg – vrstva V; K: 6793 mg/kg – vrstva III a Mg: 1213 mg/kg – vrstva II) byly nižší, oproti hodnotám naměřeným u žížal z ostatních zakládek.

Celkový a přístupný obsah prvků (P, K, Mg) byl stanoven u vermikompostovacích zakládek s BRKO, lihovarskými výpalky a matolinou. Nejvyšší obsah celkového P byl naměřen ve vrstvě I (nejstarší vrstvě) vermikompostovací zakládky s lihovarskými výpalky (6 942 mg/kg). Nejvyšší obsah přístupného P pro rostliny byl však naměřen ve vrstvě I (nejstarší vrstvě) vermikompostovací zakládky s matolinou 1 089 mg/kg, nejvyšší procento přístupného P z celkového obsahu (cca 42 %) bylo vypočteno u vrstvy V (nejmladší vrstvy). Hodnota přístupného P u varianty s matolinou byla téměř dvakrát vyšší než přístupný obsah P u vrstvy I vermikompostovací zakládky s lihovarskými výpalky. Nejvyšší obsah celkového K 18 854 mg/kg byl naměřen ve vrstvě III vermikompostovací zakládky s lihovarskými výpalky. Nejvyšší obsah (12 797 mg/kg) i procento (91,7 %) přístupného K pro rostliny byl naměřen také ve vermikompostovací zakládce s lihovarskými výpalky, avšak u vrstvy nejmladší (vrstva IV). Procento přístupného K bylo u všech vermikompostovacích zakládek velmi vysoké (55,5 – 91,7 %). Nejvyšší hodnota celkového Mg (6 067 mg/kg vrstva II) byla naměřena u vermikompostovací zakládky s BRKO. Nejvyšší hodnota i procento přístupného Mg byly taktéž naměřeny u vermikompostovací zakládky s BRKO (850 mg/kg; 14,5 %), ale u vrstvy I (nejstarší vrstva). Pattnaik a Reddy (2010) vermikompostovali odpad ze zeleninového trhu a rostlinný odpad po dobu 60 dnů za využití žížal *E. fetida*. Celkové hodnoty prvků obsažených ve vermikompostu ze zeleninového trhu byly 0,9 % P (9 000 mg/kg), 0,8 % K (8 000 mg/kg) a 0,9 % Mg (9 000 mg/kg). Hodnoty P a Mg byly v jejich variantě vermikompostu z odpadu ze zeleninového trhu vyšší než hodnoty naměřené v našich vermikompostovacích zakládkách. Ve vermikompostu z rostlinného odpadu naměřili 0,6 % P (6 000 mg/kg), 0,3 % K (3 000 mg/kg) a 0,6 % Mg (6 000 mg/kg), tyto hodnoty byly nižší než námi naměřené nejvyšší hodnoty prvků. Hodnota K byla u rostlinného odpadu dokonce několikanásobně nižší než námi naměřená hodnota celkového K. Hanč a Chadimová (2014) vermikompostovali jablečné výlisky v laboratorních podmínkách v systému jednorázového krmení žížal *E. andrei*. Obsah P, K a Mg přístupného rostlinám, ve vermikompostu z jablečných výlisků, tvořil přibližně 16 % P, 62 % K a 15 % Mg z celkového obsahu, což až na procento přístupného P odpovídá námi naměřeným hodnotám.

Ve všech vrstvách vermikompostovacích zakládek byl naměřen vyšší obsah bakterií než hub. Nejvyšší poměr bakterií a hub byl nalezen ve vrstvě III ve vermikompostovací zakládce s kalem ze sladovny (158,6:1). Tato vrstva se ovšem statisticky významně nelišila od ostatních vrstev. Naopak nejnižší poměr (bakterií a hub) byl nalezen ve vrstvě IV (nejmladší vrstva) vermikompostovací zakládky s lihovarskými výpalky (4,7:1). Tato vrstva také vykazovala nejvyšší obsah bakterií (119,7 $\mu\text{g PLFA.g}^{-1}$ sušiny) a hub (25,4 $\mu\text{g PLFA.g}^{-1}$ sušiny),

byla zde však vypočtena nejvyšší hodnota směrodatné odchylky, což bylo způsobeno značnou nehomogenitou vermikompostovací směsi. Koncentrace hub ve všech vrstvách vermikompostovací zakládky s matolinou byla téměř srovnatelná jako u vermikompostovací zakládky s lihovarskými výpalky. Gómez-Brandón et al. (2011a) také naměřili téměř 100 – krát vyšší aktivitu bakterií než hub při vermikompostování prasečí kejdy ve vermikompostovacích reaktorech za použití žížal *E. fetida*. Nejvyšší aktivita těchto dvou skupin mikroorganismů byla v jejich experimentu naměřena v devět týdnů staré vrstvě vermikompostu (bakteriální PLFA 400 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny a houbové PLFA 5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny). Aria et al. (2011) vermikompostovali kravský hnůj ve vermireaktoru umístěném ve skleníku v systému průběžného krmení žížal *E. andrei*. Mikrobiální biomasa v jejich experimentu byla vyšší v horní vrstvě než ve vrstvě spodní. Hodnota bakteriální PLFA (cca 700 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny) byla v horní vrstvě jejich vermireaktoru několikanásobně vyšší než v našich vermikompostovacích zakládkách. Obsah hub v horní vrstvě jejich experimentu byl cca 20 $\mu\text{g PLFA}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny, což je srovnatelné s našimi nejvyššími hodnotami obsahu hub. U vermikompostovacích zakládek s BRKO, lihovarskými výpalky a matolinou byly z bakterií nejaktivnější G- bakterie následované G+ bakteriemi. Obsah aktinobakterií byl téměř potlačen. Fernández-Gómez et al. (2013) vermikompostovali rostlinný odpad v kombinaci s papírenským kalem v poměru 2:1 po dobu 24 týdnů za použití žížal *E. fetida*. Hodnoty mikroorganismů byly v jejich experimentu naměřeny ve stejném pořadí, jako u našich vermikompostovacích zakládek (bakterie 43 nmol PLFA $\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny, G- bakterie 19 nmol PLFA $\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny, G+ bakterie 18 nmol PLFA $\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny, houby 8 nmol PLFA $\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny, aktinobakterie 4 nmol PLFA $\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny). Gómez-Brandón et al. (2012) uvedli, že koncentrace G- a G+ bakterií a také hub mohou být nižší díky vyšší aktivitě žížal. Tvrzení Rouska et al. (2010), že aktinobakterie jsou aktivnější při nižších hodnotách pH, opodstatňuje námi naměřené nízké hodnoty aktinobakterií. Nižší počet houbových kolonií může být dle Schönholzera et al. (1999) způsoben tím, že houbové buňky slouží žížalám jako zdroj potravy. Výskyt a rozmnožování hub jsou také ovlivněny hodnotami pH, ty se lépe rozmnožují při nižších hodnotách pH, naopak, při vyšších hodnotách jejich produkce klesá (Gock et al. 2003).

Aktivita β -D-glukosidázy vykazovala přibližně stejný trend v průběhu vermikompostování BRKO jako v průběhu vermikompostování kalu ze sladovny. Nejvyšší aktivita β -D-glukosidázy byla naměřena během vermikompostování lihovarských výpalků (2 053 $\mu\text{mol MUFG}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ve vrstvě IV). Naopak nejnižší aktivita byla naměřena při vermikompostování matoliny (429 $\mu\text{mol MUFG}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ve vrstvě IV). Velká variabilita hodnot ve vermikompostovací zakládce s matolinou byla způsobena vysokým podílem semínek,

kteře nejsou žížaly schopny rozkládat. Vysoké hodnoty v zakládce s matolinou mohly být způsobeny hodnotou EC, která byla nejnižší ve vrstvě II, kde byla hodnota β -D-glukosidázy nejvyšší. Mondini et al. (2004) uvedli, že v případě kompostování odpadu z bavlny a kompostování kombinace odpadu z bavlny s odpadem ze zahrady, se aktivita β -glukosidázy zvýšila s délkou kompostování, ačkoli se aktivita v jejich experimentu snížila po 40 dnech kompostování, následně se zvýšila po 80 dnech kompostování a znovu klesla po 120 dnech a 180 dnech kompostování. Také Fernández-Gómez et al. (2010) změřili aktivitu β -glukosidázy, při vermikompostování odpadu z rajčat v systému průběžného krmení za použití žížal *E. fetida*. Aktivita vzrostla až na 6000 $\mu\text{g p-nitrofenol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (po 90 dnech) a poté klesala až do konce experimentu (210 dní). Aktivita β -glukosidázy tedy závisí na druhu biologického odpadu. Lazcano a Domínguez (2011) se zajímali o vliv vermikompostu na úrodnost půdy a růst rostlin. Zabývali se také obsahem enzymů v půdě po aplikaci vermikompostu, hnoje a konvenčního hnojiva. Experiment ukázal, že aktivita glukosidázy byl statisticky významně vyšší ve variantě s vermikompostem (120 000 $\mu\text{g p-nitrofenol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) než ve variantě s konvenčním hnojivem (100 000 $\mu\text{g p-nitrofenol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Aktivita kyselé fosfatázy během vermikompostování BRKO vykazovala podobný trend jako aktivita β -D-glukosidázy. V průběhu procesu vermikompostování kalu ze sladovny byla aktivita kyselé fosfatázy téměř konstantní. Nejvyšší aktivita byla naměřena v nejmladší vrstvě vermikompostovací zakládky s lihovarskými výpalky (2 197 $\mu\text{mol MUFP.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) a s matolinou (2 035 $\mu\text{mol MUFP.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$), což mohlo být způsobeno nejvyšším obsahem bakterií a hub v těchto vrstvách a stejně tak i nízkým pH vstupních surovin. Naopak nejnižší aktivita byla ve vrstvě II vermikompostovací zakládky s BRKO (608 $\mu\text{mol MUFP.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Pramanik et al. (2007) analyzovali aktivitu kyselé fosfatázy několika druhů biologicky rozložitelných odpadů po 70 – 85 dnech vermikompostování za využití žížal *E. fetida*. Vermikompostavali kravský hnůj, čerstvou trávu, plevel a tuhý komunální odpad. Nejvyšší aktivita byla po 70 – 85 dnech vermikompostování naměřena ve vermikompostu z kravského hnoje (přibližně 180 000 $\mu\text{g p-nitrofenol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Nejnižší aktivita byla měřena ve variantě s tuhým komunálním odpadem (přibližně 120 000 $\mu\text{g p-nitrofenol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Aktivita kyselé fosfatázy popsaná v experimentu Mondini et al. (2004) se lišila dle druhu biologicky rozložitelného odpadu. Pokus zahrnoval kompostování organických zbytků (bavlněného odpadu, odpadu ze dvora a směsi těchto dvou bioodpadů) v perforovaných plastových bednách umístěných venku pod střechou po dobu 149 dnů. Nejvyšší aktivitu naměřili v kompostu ze směsi těchto dvou bioodpadů (přibližně 8 500 $\mu\text{g p-nitrofenol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) po 40 dnech kompostování, naopak nejnižší aktivita byla naměřena na počátku experimentu v kompostu z bavlněného odpadu

(přibližně 2 000 $\mu\text{g p-nitrofenol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Několik studií se zabývalo aplikací vermikompostu na půdu a jeho účinkem na enzymy ve vztahu k úrodnosti půdy. Lazcano a Dominguez (2011) zjistili, že varianta hnojená vermikompostem vykazovala vyšší obsah fosfatázy (přibližně 160 000 $\mu\text{g p-nitrofenol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$), než varianta hnojená konvenčním hnojivem (přibližně 140 000 $\mu\text{g p-nitrofenol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Také v experimentu provedeném Marinari et al. (2000) a Sahoo et al. (2008) došlo ke statisticky významnému zvýšení obsahu kyselé fosfatázy po aplikaci vermikompostu do půdy. Díky tomu je možné tvrdit, že je aplikace vermikompostu do půdy velmi dobrá, neboť má příznivý účinek na transformaci organického fosforu, což je důležité pro udržení vhodného prostředí pro mikroby a kořeny rostlin (Saha et al. 2008).

Výše aktivity arylsulfatázy v jednotlivých vrstvách vermikompostovacích zakládek byla velmi podobná, především u varianty s BRKO, lihovarskými výpalky a s kalem ze sladovny. Pokles aktivity arylsulfatázy byl však naměřen ve vrstvě II u vermikompostovací zakládky s BRKO a lihovarskými výpalky, u vermikompostovací zakládky s kalem ze sladovny byl zjištěn pokles až u vrstvy III. Aktivita arylsulfatázy byla během procesu velmi nízká, její hodnoty se u všech vermikompostovacích zakládek pohybovaly od 13 $\mu\text{mol MUFS.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (vrstva I, matolina) do 66 $\mu\text{mol MUFS.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (vrstva V, BRKO). Mezi jednotlivými vrstvami vermikompostovacích zakládek, kromě zakládky s lihovarskými výpalky, nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly. Mondini et al. (2004) také analyzovali aktivitu arylsulfatázy. Ta byla mnohonásobně nižší než aktivita jiných enzymů (β -glukosidáza, kyselá fosfatáza a alkalická fosfatáza). Aktivita se však zvýšila kolem 120. dne a 160. dne kompostování. Aktivitu arylsulfatázy měřili také Růžek et al. (2015) v experimentu s kompostem ze zeleného odpadu (zelený komunální odpad, bílá rašelina, jílovitá půda a perlit). Měřili aktivitu v kontrolní variantě (čerstvý kompost) a také třikrát během skladování kompostu (7 – 14 dní; 15 – 20 dní; 21 – 147 dní). Nejvyšší aktivitu, naměřili po 15 – 20 dnech skladování kompostu (520 $\text{mg p-nitrofenol.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$), naopak nejnižší aktivitu, naměřili v kontrolní variantě (292 $\text{mg p-nitrofenol.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$). Tejada et al. (2010) zkoumali vliv vermikompostu z kravského hnoje, zelené píče a jejich kombinace, na vlastnosti půdy. Lepší vliv na půdní vlastnosti měl vermikompost čistě z kravského hnoje, kde byly hodnoty arylsulfatázy o 14,2 % vyšší než u ostatních variant.

U aktivity lipázy, byl vývoj napříč vrstvami u zakládky s matolinou opačný oproti vývoji u ostatních vermikompostovacích zakládek. Aktivita lipázy byla velmi vysoká ve všech vermikompostovacích zakládkách, pohybovala se v rozmezí od 4 223 $\mu\text{mol MUFY.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ do 12 341 $\mu\text{mol MUFY.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Nejnižší hodnoty byly naměřeny u zakládky s lihovarskými výpalky, kde byl také nejnižší počet a biomasa žížal. Naopak nejvyšší hodnota byla naměřena

ve vermikompostovací zakládce s kalem ze sladovny (vrstva V). Velmi vysoké hodnoty vykazovala ve všech vrstvách zakládka s matolinou, kde byl taktéž nejvyšší počet i biomasa žížal.

Chitináza je produkována především houbami, které byly neaktivnější během procesu vermikompostování lihovarských výpalků a matoliny. Nejvyšší aktivita chitinázy byla několikanásobně vyšší právě u vermikompostovací zakládky s lihovarskými výpalky. V případě zakládky s kalem ze sladovny byly hodnoty velmi nízké, ale i tak byly mezi jednotlivými vrstvami nalezeny statisticky významné rozdíly. Velmi nízké hodnoty u varianty s kalem ze sladovny mohly být způsobeny nízkými hodnotami bakterií a hub. Aktivita chitinázy může být také potlačována svými vlastními produkty, jako jsou glukóza či N-acetylglukosamin (Gooday 1994). Aktivita chitinázy měřená Leeem et al. (2016) během procesu kompostování směsi biologického odpadu (prasečí a drůbeží hnůj, vyplozený houbový substrát, piliny, zbytky po zpracování rýže s přídavkem hnojiv obsahujících Mo, Zn, B, Mn a Cu) klesala s dobou kompostování ($550 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ na počátku kompostování; $400 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ po 90 dnech kompostování).

Nejvyšší aktivita celobiohydrolázy byla naměřena ve vermikompostovací zakládce s lihovarskými výpalky. Úroveň enzymatické aktivity celobiohydrolázy měla u zakládky s BRKO a lihovarskými výpalky v celém profilu stejný trend jako aktivita chitinázy. Vysoké hodnoty u zakládky s BRKO mohly být způsobeny velkou rozmanitostí vstupních surovin, které byly velmi různorodé dle typu domácnosti a ročního období. Důvodem mohla být také velmi vysoká hodnota EC. Vysoké hodnoty u zakládky s lihovarskými výpalky byly pravděpodobně způsobeny vysokým obsahem hub.

Aktivita alanin aminopeptidázy byla nejnižší během procesu vermikompostování matoliny, kde byla v několika vrstvách pod mezí detekce. Vyšší hodnoty byly naměřeny ve vermikompostovací zakládce s BRKO, pravděpodobně kvůli vysokým hodnotám EC. Několikanásobně vyšší hodnoty byly naměřeny u vermikompostovací zakládky s lihovarskými výpalky, kde se hodnoty pohybovaly v rozmezí od $158 \mu\text{mol AMCA}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ve vrstvě I do $258 \mu\text{mol AMCA}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ve vrstvě IV.

Leucin aminopeptidáza vykazovala nejvyšší hodnoty ($334 \mu\text{mol AMCL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) u vermikompostovací zakládky s lihovarskými výpalky ve vrstvě IV a u vermikompostovací zakládky s BRKO ve vrstvě III ($154 \mu\text{mol AMCL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). Nejnižší hodnoty byly naopak naměřeny u vermikompostovací zakládky s matolinou $4,7 - 37,51 \mu\text{mol AMCL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Aktivita alanin i leucin aminopeptidázy klesala se stářím vrstev pouze u vermikompostovací zakládky s lihovarskými výpalky. U ostatních zakládek se nedá jednoznačně hovořit o jakémsi trendu poklesu či nárůstu aktivity se stářím vrstev.

Aktivita ureázy a nitrát reduktázy byla měřena pouze u vermikompostovací zakládky s lihovarskými výpalky. Aktivita ureázy se pohybovala v rozmezí od 66 $\mu\text{g NH}_4\text{-N.g}^{-1} \cdot 2 \text{ h}^{-1}$ ve vrstvě I do 186 $\mu\text{g NH}_4\text{-N.g}^{-1} \cdot 2 \text{ h}^{-1}$ ve vrstvě III. Vyšší aktivitu ureázy ve vermikompostu (104 $\mu\text{g NH}_4\text{-N.g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) naměřili Romero et al. (2010), kteří používali vermikompost z matoliny k obohacení půdy o živiny. Téměř stejnou hodnotu (cca 102 $\mu\text{g NH}_4\text{-N.g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) naměřili i Pramanik et al. (2007) v kontrolní variantě vermikompostu z kravského hnoje po 70 – 85 dnech vermikompostování v systému jednorázového krmení žížal *E. fetida*. Hodnoty aktivity nitrát reduktázy byly naměřeny mezi 0,6 $\mu\text{g NO}_2\text{-N.g}^{-1} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$ ve vrstvě I – 12 $\mu\text{g NO}_2\text{-N.g}^{-1} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$ ve vrstvě IV. Kvůli velkým směrodatným odchylkám nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly. To mohlo být způsobeno kombinací velmi tekutých lihovarských výpalků se slámou, kde mohlo docházet k nerovnoměrnému rozložení samotných výpalků napříč profilem.

7. Závěr

Předkládaná práce je souborem čtyř již publikovaných komentovaných impaktovaných vědeckých prací. Dosavadní studie se vermikompostováním ve velkém měřítku v konkrétních podnicích, v systému průběžného krmení za použití žížal *E. andrei*, nezabývají. Možnost využívání bioodpadu pomocí žížal přímo v místě jeho vzniku ve velkém měřítku není příliš rozšířena.

Práce se zabývala vermikompostováním čtyř biologicky rozložitelných odpadů v kombinaci s dalšími surovinami. Jednalo se o vermikompostování biologicky rozložitelného odpadu ze zahrad a domácností, kalu ze sladovny (20 %obj.) se zemědělským bioodpadem, lihovarských výpalků spolu se slámou (50:50) a matoliny. U všech vermikompostovacích zakládek byla stanovována celá řada agrochemických a biologických parametrů. Cílem práce bylo porovnat hodnoty počtu a biomasy žížal v jednotlivých vermikompostovacích zakládkách, vyhodnotit jednotlivé vlastnosti vrstev odlišného stáří a zralých vermikompostů, stanovit a porovnat hodnoty celkového a přístupného obsahu prvků v jednotlivých vrstvách vermikompostovacích zakládek, zjistit, které enzymy a v jakém rozsahu jsou při vermikompostování produkovány.

První hypotéza, že se bude počet a biomasa žížal v průběhu procesu lišit dle použitého bioodpadu, byla potvrzena. Hodnoty počtu i biomasy žížal se značně lišily dle zvoleného druhu bioodpadu. Nejvyšší počet i biomasa žížal byl u varianty s matolinou, naopak nejnižší hodnoty byly u varianty s lihovarskými výpalky.

Druhá hypotéza, že se s rostoucí dobou vermikompostování bude zvyšovat stabilita a zralost vermikompostu, se taktéž potvrdila. Jedním z hlavních ukazatelů stability a zralosti vermikompostu je poměr C:N, který se u všech sledovaných vermikompostovacích zakládek snižoval spolu s délkou vermikompostování.

Třetí hypotéza, že bude nalezen statisticky významný rozdíl v celkovém a přístupném obsahu prvků mezi vrstvami jednotlivých vermikompostovacích zakládek, se z větší části potvrdila. Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými vrstvami byly u celkového i přístupného obsahu prvků nalezeny téměř u všech vermikompostovacích zakládek. Nebyly nalezeny pouze u celkového obsahu draslíku u zakládky s matolinou a u přístupného obsahu fosforu u zakládky s lihovarskými výpalky.

Poslední hypotéza, že bude naměřena nejvyšší enzymatická aktivita v horních vrstvách vermikompostovacích zakládek, se z větší části nepotvrdila. Nejvyšší aktivita téměř u všech enzymů byla v horní vrstvě naměřena pouze u vermikompostovací zakládky s lihovarskými

výpalky. U všech vermikompostovacích zakládek byla nejvyšší hodnota v horní vrstvě naměřena pouze u aktivity kyselé fosfatázy, arylsulfatázy a lipázy.

Ačkoli se od sebe jednotlivé vermikompostovací zakládky lišily, tak proces vermikompostování probíhal ve všech vermikompostovacích zakládkách správně a podle předpokladů. U všech vermikompostovacích zakládek se ve spodních vrstvách vytvořil kvalitní vermikompost, který může být dále použit jako hnojivo.

Nejlepší hodnoty finálního produktu, tedy vermikompostu, vykazoval z hlediska celkového obsahu prvků vermikompost z procesu vermikompostování matoliny. Jednalo se o zralý vermikompost, o čemž svědčí nejen hodnota C:N, ale i hodnota N-NH₄⁺, DOC, či velmi nízká aktivita mikroorganismů. Z hlediska přístupného obsahu prvků však nelze určit ideální bioodpad pro vermikompostování, neboť každý ze sledovaných přístupných prvků pro rostliny dosahoval nejvyšších hodnot v jiné vermikompostovací zakládce.

8. Seznam použité literatury

- Aira M, Monroy F, Domínguez J. 2007. Earthworms strongly modify microbial biomass and activity triggering enzymatic activities during vermicomposting independently of the application rates of pig slurry. *Science of The Total Environment*. **385**: 252-261.
- Aria M, Gómez-Brandón M, González-Porto P, Domínguez J. 2011. Selective reduction of the pathogenic load of cow manure in an industrial-scale continuous-feeding vermireactor. *Bioresource Technology* **102**: 9633–9637.
- Arthur GD, Aremu AO, Kulkarni MG, Staqden JV. 2012. Vermicompost leachate alleviates deficiency of phosphorus and potassium in tomato seedlings. *HortScience* **47**: 1304–1307.
- Atiyeh RM, Domínguez J, Subler S, Edwards CA. 2000a. Changes in biochemical properties of cow manure during processing by earthworms (*Eisenia andrei*, Bouché) and the effect on seedling growth. *Pedobiologia* **44**: 709-724.
- Atiyeh RM, Subler S, Edwards CA, Bachman G, Metzger JD, Shuster W. 2000b. Effect of vermicomposts and composts on plant growth in horticultural container media and soil. *Pedobiologia* **44**: 579-590.
- Baldrian P. 2009. Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. *Plant Soil Environment* **55**: 370–378.
- Bernal MP, Alburquerque JA, Moral R. 2009. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. *Bioresource Technology*. **100**: 5444-5453.
- Bevacqua RF, Mellano VJ. 1993. Sewage sludge compost's cumulative effects on crop growth and soil properties. *Compost Sci Utilization* **1**: 34–37.
- Bhadoria T, Ramakrishnan PS. 1996. Role of earthworms in nitrogen cycling during the cropping phase of shifting agriculture (Jhum) in north-east India. *Biology and Fertility of Soils* **22**: 350–354.
- Björklund A, Bjuggren C, Dalemo M, Sonesson U. 1999. Planning biodegradable waste management in Stockholm. *Journal of Industrial Ecology* **3**: 43-58.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**: 911–917.
- Bočková J, Kleňha J. 1972. *Celulázy – jejich biochemie a technologie*. Výzkumný ústav potravinářského průmyslu – středisko technických informací, Praha.
- Borkovcová M, Žáková M. 2015. *Biologie pro odpadové hospodářství*. Mendelova univerzita v Brně, Brno. ISBN 978-7509-240-3.

- Brenda. 2019. Enzyme database. The comprehensive Enzyme Information System, Available from <http://www.brenda-enzymes.info/> (accessed January 2019).
- Carrasquero-Durán A, Flores I. 2009. Evaluation of lead (II) immobilization by a vermicompost using adsorption isotherms and IR spectroscopy. *Bioresource Technology* **100**: 1691-1694.
- Crecchio C, Curci M, Pizzigallo M, Ricciuti P, Ruggiero P. 2004. Effects of municipal solid waste compost amendments on soil enzyme activities and bacterial genetic diversity. *Soil Biol. Biochem* **36**: 1595–1605.
- ČSN EN 13651. 2002. Půdní melioranty a stimulanty růstu – Extrakce živin rozpustných v chloridu vápenatém / DTPA (CAT), Praha.
- ČSN EN 15933. 2013. Kaly, upravený bioodpad a půdy – Stanovení pH, Praha.
- ČSN EN 46 5736. 2018. Vermikomposty, Praha.
- Dick WA. 1984. Influence of long-term tillage and crop rotation combinations on soil enzyme activities. *Soil Sci Soc Am J* **48**: 569–574.
- Dickerson GW. 2001. Vermicomposting. New Mexico State University, Guide H-164. p. 4.
- Domínguez J, Aira M, Gómez-Brandón M. 2010. Vermicomposting: Earthworms Enhance the Work of Microbes. Pages 93-114 in Insam H, Franke-Whittle I, Goberna M, editors. *Microbes at Work: From Wastes to Resources*. Springer, Berlin. Heidelberg. ISBN: 9783642040429.
- Domínguez J, Edwards CA. 2011. Biology and ecology of earthworm species used for vermicomposting. Pages 25-37 in Arancon NQ, Sherman RL, editors. *Vermiculture Technology Earthworms. Organic Waste and Environmental Management*. CRC Press, Boca Raton. ISBN: 978-1-4398-0987-7.
- Domínguez J, Gómez-Brandón M. 2013. The influence of earthworms on nutrient dynamics during the process of vermicomposting. *Waste Management & Research* **31**: 859–868.
- Domínguez J, Martínez-Cordeiro H, Lores M. 2016. Earthworms and Grape Marc: Simultaneous Production of High-Quality Biofertilizer and Bioactive-Rich Seeds. Pages 167–183 in Morata A, Loira I, editors. *Grape and Wine Biotechnology*. Intech, London.
- Domínguez J, Martínez-Cordeiro H, Álvarez-Casas M, Lores M. 2014. Vermicomposting grape marc yields high quality organic biofertiliser and bioactive polyphenols. *Waste Management & Research* **32**: 1235-1240.
- Edwards CA, Arancon NQ. 2004. The science of vermiculture: The use of earthworms in organic waste management. Pages 16-18 in: Edwards CA, editor. *Earthworm ecology*. CRC Press, Boca Raton. ISBN: 9780849318191.

- Edwards CA, Arancon NQ, Sherman R. 2011. Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Wastes, and Environmental Management. CRC Press, Boca Raton. ISBN 978-1-4398-0987-7.
- Elad Y, Shtienberg D. 1994. Effect of compost water extracts on grey mould (*Botrytis cinerea*). Crop Protection **13**: 109-114.
- Enowashu E, Kandeler E, Lamesdorf N, Poll C. 2009. Microbial biomass and enzyme activities under reduced nitrogen deposition on a spruce forest soil. Applied Soil Ecology **43**: 11-21.
- Fernández-Gómez MJ, Nogales R, Insam H, Romero E, Goberna M. 2010. Continuous-feeding vermicomposting as a recycling management method to revalue tomato-fruit wastes from greenhouse crops. Waste Management **30**: 2461-2468.
- Fernández-Gómez MJ, Nogales R, Insam H, Romero E, Goberna M. 2011. Role of vermicompost chemical composition, microbial, functional diversity and fungal community structure in their microbial respiratory response to three pesticides. Bioresource Technology **102**: 9638–9645.
- Fernández-Gómez MJ, Díaz-Raviña M, Romero E, Nogales R. 2013. Recycling of environmentally problematic plant waste generated from greenhouse tomato crops through vermicomposting. International Journal of Environmental Science Technology **10**: 697–708.
- Ferrer J, Páez G, Mármol Z, Ramones E, Chandler C, Marin M, Ferrer A. 2001. Agronomic use of biotechnologically processed grape wastes. Bioresource Technology **76**: 39-44.
- Filip J, Oral J. 2002. Odpadové hospodářství II. MZLU, Brno. ISBN 80-7157-682-4
- Flack FM, Hartenstein R. 1984. Growth of the earthworm *Eisenia foetida* on microorganisms and cellulose. Soil Biology and Biochemistry **16**: 491-495.
- Gaddie RE (Sr.), Douglas DE. 1975. Earthworms for Ecology and Profit. Scientific Earthworm Farming. Bookworm Publishing Company, California. ISBN: 0916302059.
- García-Sánchez M, Taušnerová H, Hanč A, Tlustoš P. 2017. Stabilization of different starting materials through vermicomposting in a continuous-feeding system: changes in chemical and biological parameters. Waste management **62**: 33-42.
- Garg VK, Gupta R. 2009. Vermicomposting of agro-industrial processing waste. Pges 431-456 in Singh nee' Nigam P, Pandey A, editors. Biotechnology for agro-industrial residues utilisation. Springer, Dordrecht. ISBN 978-1-4020-9941-0.
- Garg P, Gupta A, Satya S. 2006. Vermicomposting of different types of waste using *Eisenia foetida*: A comparative study. Bioresource Technology **97**: 391–395.

- Georg J. 2004. Feasibility of Developing the Organic and Transitional Farm Market for Processing Municipal and Farm Organic Wastes using large – Scale Vermicomposting. Good Earth Organic Resources Group, Nova Scotia.
- Ginting D, Kessavalou A, Eghball B, Doran JW. 2003. Greenhouse gas emissions and soil indicators four years after manure and compost applications, *Journal of Environmental Quality* **32**: 23–32.
- Gock MA, Hocking AD, Pitt JI, Poulos PG. 2003. Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. *International Journal of Food Microbiology* **81**: 11–19.
- Gómez-Brandón M, Aria M, Loreas M, Domínguez J. 2011a. Changes in microbial community structure and function during vermicomposting of pig slurry. *Bioresource Technology* **102**: 4171-4178.
- Gómez-Brandón M, Lazcano C, Lores M, Domínguez J. 2011b. Short-term stabilization of grape marc through earthworms. *Journal of Hazardous Materials* **187**: 291–295.
- Gómez-Brandón M, Lores M, Domínguez J. 2012. Species-Specific Effects of Epigeic Earthworms on Microbial Community Structure during First Stages of Decomposition of Organic Matter. *PLoS ONE* 7 (e31895) DOI: 10.1371/journal.pone.0031895.
- Gooday GW. 1994. Physiology and microbial degradation of chitin and chitosan. Pages 279-312 in Ratledge C, editor. *Biochemistry of Microbial Degradation*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. ISBN: 978-94-011-1687-9.
- Gunadi B, Blount C, Edwards CA, 2002. The growth and fecundity of *Eisenia fetida* (Savigny) in cattle solids pre-composted for different periods. *Pedobiologia* **46**: 15-23.
- Hageman RH, Hucklesby DP. 1971. Nitrate reductase from higher plants. *Methods in Enzymology* **23**: 491-503.
- Hanč A. 2017. Vermikompostovat lze na zahradě i doma. *Zahrádkář* **49**: 52-53.
- Hanč A, Chadimová Z. 2014. Nutrient recovery from apple pomace waste by vermicomposting technology. *Bioresource Technology* **168**: 240-244.
- Hanč A, Částková T, Bazalová M. 2018. Změny enzymatické aktivity a metody jejího stanovení během procesu vermicompostování v systému průběžného krmení (certifikovaná metodika). Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha. ISBN 978-80-213-2865-5.
- Hanč A, Částková T, Kužel S, Cajthaml T. 2017. Dynamics of a vertical-flow windrow vermicomposting system. *Waste Management & Research* **35**: 1121-1128.
- Hanč A, Plíva P. 2012. Vermicomposting of garden biowaste and sewage sludge. *Waste forum* **3**: 103-110.

- Hanč A, Plíva P. 2013. Vermikompostování bioodpadů (certifikovaná metodika). Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha. ISBN 978-80-213-2422-0.
- Hanč A, Vašák F. 2015. Processing separated digestate by vermicomposting technology using earthworms of the genus *Eisenia*. Int. J. Environ. Sci. Technol. **12**: 1183-1190.
- He XT, Traina SJ, Logan TJ. 1992. Chemical properties of municipal solid waste composts. Journal of Environmental Quality **21**: 318–319.
- Hidayati N, Ali U, Murwani I. 2017. Chemical composition of vermicompost made from organic wastes through the vermicomposting and composting with the addition of fish meal and egg shells flour. Journal of Pure Applied Chemistry Research **6**: 127–136.
- Horáková D, Němec M. 2003. Laboratorní cvičení z fyziologie bakterií. Masarykova univerzita, Brno.
- Huang K, Li F, Wei Y, Fu X, Chen X. 2014. Effects of earthworms on physicochemical properties and microbial profiles during vermicomposting of fresh fruit and vegetable wastes. Bioresource technology **170**: 45-52.
- Hue NV, Liu J. 1995. Predicting compost stability. Compost Science & Utilization **3**: 8-15.
- Champar-Ngam N, Iwai CB, Ta-oun M. 2010. Vermicompost: tool for agro-industrial waste management and sustainable agriculture. International Journal of Environmental and Rural Development. **2010**: 38-43.
- Ismail S, Thampan PK. 1995. Earthworms in soil fertility management. Organic agriculture **77**: 100-106.
- Jin B, Kelly JM. 2009. Wine industry residues. Pages 293-311 in Nigam PSN, Pandey A, editors. Biotechnology for agro-industrial residues utilisation. Springer Science & Business Media, Netherlands. ISBN: 978-1-4020-9941-0.
- Kalina M. 2004. Hnojení půdy a kompostování v zahradě. Grada Publishing a.s., Praha. ISBN 978-80-247-5848-0.
- Kráska O. 2014. Na bioodpad se žížalami. Odpady **24**: 18.
- Lazcano C, Domínguez J. 2011. The use of vermicompost in suitable agriculture: Impact on plant growth and soil fertility. Nova Science Publishers, Inc., New York. ISBN: 978-1-61324-785-3.
- Lee YS, Choi SY, Lee JO, Kang JH, Kim KY. 2016. Comparative assessment of enzyme activities and characteristics during composting of two types of composts. Communications in Soil Science and Plant Analysis **47**: 1845-1855.
- Linek J. 2002. Využití lipáz k biokatalýze organických reakcí. Bioprospect **12**: 8-12.

- 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.
- Lv BY, Xing MY, Yang J, Qi WS, Lu YS. 2013. Chemical and spectroscopic characterization of water extractable organic matter during vermicomposting of cattle dung. *Bioresource Technology* **132**: 320–326.
- Malat'ák J, Vaculík P. 2008. Technologická zařízení staveb odpadového hospodářství. Česká zemědělská univerzita, Praha.
- Mana R. 2020. V metropoli se více třídí, omezit produkci odpadu se nedaří. Pražské služby, Praha. Available from <https://www.psas.cz/v-metropoli-se-vice-tridi-omezit-produkci-odpadu-se-nedari> (accessed January 2020).
- Marcinčák P. 2015. Matoliny a žížaly, ideální kombinace. *Vinařský obzor* **108**: 377.
- Marinari S, Masciandaro G, Ceccanti B, Grego S. 2000. Influence of organic and mineral fertilisers on soil biological and physical properties. *Bioresource Terchnology* **72**: 9-17.
- Mc Bride MB. 2003. Toxic metals in sewage sludge-amended soils: Has promotion of beneficial use discounted the risks?. *Advances in Environmental Research* **8**: 5–19.
- Mc Lean MA, Parkinson D. 1998. Impacts of the epigeic earthworm *Dendrobaena octaedra* on oribatid mite community diversity and microarthropod abundances in pine forest floor: a mesocosm study. *Applied Soil Ecology* **7**: 125–136.
- Mertz B, Hill AD, Mulakala C, Reilly PJ. 2007. Automated docking to explore subsite binding by glycoside hydrolase family 6 cellobiohydrolases and endoglucanases. *Biopolymers* **87**: 249-260.
- Mikeš J. 2008. Biofiltrace jako prostředek eliminace zápachu při anaerobní digesci. *Odpadové fórum* **12**: 19-20.
- Ministerstvo životního prostředí. 2016. Vyhláška č. 93/2016 Sb. ze dne 23. března 2016, o Katalogu odpadů, Pages 1802-1831 in *Sbírka zákonů České republiky, 2016, částka 38*. Česká republika.
- Ministerstvo zemědělství, Vyhláška č. 271/2009 Sb. ze dne 27. srpna 2009, kterou se mění vyhláška Ministerstva zemědělství č. 474/2000 Sb., o stanovení požadavků na hnojiva, ve znění pozdějších předpisů, *Sbírka zákonů České republiky, 2009, částka 82*. Česká republika.
- Mondini C, Fornaiser F, Sinicco T. 2004. Enzymatic activity as a parameter for the characterization of the composting process. *Soil Biology & Biochemistry* **36**: 1587-1594.

- 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.
- Munroe G. 2007. Manual of on-farm vermicomposting and vermiculture. Organic Agriculture Centre of Canada **39**: 40.
- Nagavallemma KP, Wani SP, Lacroix S, Padmaja VV. 2004. Vermicomposting: Recycling Wastes into Valuable Organic Fertilizer. Global Theme on Agroecosystems Report no. 8. Monograph. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. Patancheru, Andhra Pradesh, India.
- Ndegwa PM, Thomson SA. 2000. Effects of C-to-N ratio on vermicomposting of biosolids. *Bioresource Technology* **75**: 7-12.
- Obroučka K, Rusín J, Chamrádová K. 2010. Možnosti využití lihovarských výpalků k výrobě bioplynu. *Waste Forum* **2010**: 58-67.
- Oravec O, Elhottová D, Křišťůfek V, Šustr V, Frouz J, Tříška J, Marialigeti K. 2004. Application of ARDRA and PLFA analysis in characterizing the bacterial communities of the food, gut and excrement of saprophagous larvae of *Penthetria holos-ericea* (Diptera: Bibionidae): A pilot study. *Folia Microbiologica* **49**: 83-93.
- Pan X, Wang X. 2009. Profiling of plant hormones by mass spectrometry. *Journal of Chromatography* **877**: 2806-2813.
- Pattnaik S, Reddy MV. 2010. Nutrient status of vermicompost of urban green waste processed by three earthworm species – *Eisenia fetida*, *Eudrilus eugeniae*, and *Perionyx excavatus*. *Applied and Environmental Soil Science* **2010**: 1-13.
- Pecl K. 2007. Jednička mezi hnojivy Vermikompost. *Zahradnictví* **8**: 24.
- Pinamonti F, Stefanini M, Dalpiaz A. 1996. Soil management effects on nutritional status and grapevine performance. *Vitic. Enol. Sci.* **51**: 76-82.
- Pinamonti F. 1998. Compost mulch effects on soil fertility nutritional status and performance of grapevine. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **51**: 239-248.
- Plíva P, Altman V, Hanč A, Hejátková K, Roy A, Souček J, Valentová L. 2016. Kompostování a kompostárny. ProfiPress s. r. o., Praha. ISBN 978-80-86726-74-8.
- Plíva P, Banout J, Habart J, Jelínek A, Kollárová M, Roy A, Tomanová D. 2006. Zakládání, průběh a řízení kompostovacího procesu. Výzkumný ústav zemědělské techniky, Praha. ISBN 80-86884-11-2.

- Pramanik P, Ghosh GK, Ghosal PK, Banik P. 2007. Changes in organic – C, N, P and K and enzyme activities in vermicompost of biodegradable organic wastes under liming and microbial inoculants. *Bioresource Technology* **98**: 2485-2494.
- Priatelía Zeme. 2003. Vermikompostovanie: dážd'ovkový kompost pre domácnosť a záhradu. Spoločnosť priateľov Země, Košice.
- Romero E, Fernández-Bayo J, Díaz JMC, Nogales R. 2010. Enzyme activity and diuron persistence in soil amended with vermicompost derived from spent grape marc and treated with urea. *Applied Soil Ecology* **44**: 198–204.
- Romero E, Plaza C, Senesi N, Nogales R, Polo A. 2007. Humid acid-like fractions in raw and vermicomposted winery and distillery wastes. *Geoderma* **139**: 397–406.
- Rostami R. 2011. Vermicomposting. In Kumar S, editor. Integrated waste management – volume II. InTechOpen. ISBN 978-953-307-447-4.
- Rousk J, Bååth E, Brookes PC, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, Knight R, Fierer N. 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arabe soil. *The ISME Journal* **4**: 1340–1351.
- Růžek L, Růžková M, Koudela M, Bečková L, Bečka D, Kruliš Z, Šárka E, Voříšek K, Ledvina Š, Šalamounová B, Venyercsanová J. 2015. Biodegradation of composites based on maltodextrin and wheat B-starch in compost. *Horticultural Science* **42**: 209-214.
- Saha, S, Mina BL, Gopinath KA, Kundu S, Gupta HS. 2008. Relative changes in phosphatase activities as influenced by source and application rate of organic composts in field crops. *Bioresource Technology* **99**: 1750-1757.
- Sharma S, Pradhan K, Satya S, Vasudevan P. 2005. Potentiality of earthworms for waste management and in other uses – A review. *Journal of American Science* **1**: 4-16.
- Shipitalo MJ, Protz R. 1989. Chemistry and micromorphology of aggregation in earthworm casts. *Geoderma* **45**: 357–374.
- Schönholzer F, Hahn D, Zeyer J. 1999 Origins and fate of fungi and bacteria in the gut of *Lumbricus terrestris* L. studied by image analysis. *FEMS Microbiology Ecology* **28**: 235–248.
- Singh MK. 2014. Handbook on Vermicomposting: Requirements, Methods, Advantages and Applications. Anchor Academic Publishing, Hamburg. ISBN: 978-3-95489-276-1.
- Singh NB, Khare AK, Bhargava DS, Bhattacharya S. 2005. Effects of initial substrate pH on vermicomposting using *Perionyx excavatus* (PERRIER, 1872). *Applied Ecology and Environmental Research* **4**: 85-97.

- Sinha RK, Agarwal S, Chauhan K, Chandran V, Soni BK. 2010. Vermiculture Technology: Reviving the Dreams of Sir Charles Darwin for Scientific Use of Earthworms in Sustainable Development Programs. *Technology and Investment* **1**: 155 – 172.
- Sinha RK, Herat S, Valani D, Chauhan K. 2009. The concept of sustainable agriculture: an issue of food safety and security for people, economic prosperity for the farmers and ecological security for the nations. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* **5**: 1-5
- Směrnice Evropského parlamentu a rady EU 2018/850. 2018. Kterou se mění směrnice 1999/31/ES o skládkách odpadů. Úřední věstník Evropské unie. 9s.
- Sulzberger R, Minátová Š. 1996. Kompost, půda, hnojení. Příroda, Bratislava. ISBN 80-07-00837-3.
- Syers JK, Springett JA. 1984. Earthworms and soil fertility. *Plant and Soil* **76**: 93-104.
- Šarapatka B, Čáp L. 2013. Uplatněná certifikovaná metodika – Enzymy, jejich význam, funkce a metody stanovení aktivity v půdě. Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, Olomouc. ISBN: 978-80-224-3361-5.
- Šnajdr J, Cajthaml T, Valášková V, Merhautová V, Petránková M, Spetz P, Leppänen K, Baldrian P. 2011. Transformation of *Quercus petraea* litter: Successive changes in litter chemistry are reflected in differential enzyme activity and changes in the microbial community composition. *FEMS Microbiology Ecology* **75**: 291–303.
- Šnajdr J, Valášková V, Merhautová V, Herinková J, Cajthaml T, Baldrian P. 2008. Spatial variability of enzyme activities and microbial biomass in the upper layers of *Quercus petraea* forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 2068–2075.
- Štursová M, Baldrian P. 2011. Effects of soil properties and management on the activity of soil organic matter transforming enzymes and the quantification of soil-bound and free activity. *Plant Soil* **338**: 99-110
- Tabatabai MA, Bremner JM. 1970. Factors Affecting Soil Arylsulfatase Activity. *Soil Science Society of America Journal* **34**: 427-429.
- Tabatabai MA, Bremner JM. 1971. Michaelis constants of soil enzymes. *Soil Biology & Biochemistry* **3**: 317-323.
- Tejada M, Gómez I, Hernández T, García C. 2010. Utilization of vermicomposts in soil restoration: Effects on soil biological properties. *Soil Biology & Biochemistry* **74**: 525-532.

- Thompson W, Leege P, Millner P, Watson ME. 2003. Test methods for the examination of composts and composting. The US composting council, US government printing office, Bethesda.
- Torres-Climent A, Gomis P, Martín-Mata J, Bustamante MA, Marhuenda-Egea FC, Pérez-Murcia MD, Pérez-Espinosa A, Paredes C, Moral R. 2015. Chemical, thermal and spectroscopic methods to assess biodegradation of winery-distillery wastes during composting. PLoS ONE (e138925) DOI: 10.1371/journal.pone.0138925.
- Tripathi G, Bhardwaj P. 2004. Decomposition of kitchen waste amended with cow manure using an epigeic species (*Eisenia fetida*) and an anecic species (*Lampito mauritii*). Bioresource Technology **92**: 215-218.
- Vodrážka Z. 1996. Biochemie. 2. opravené vydání, Academia, Praha. ISBN 80-200-0600-1.
- Yadav A, Garg VK. 2011a. Industrial wastes and sludges management by vermicomposting. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology **10**: 243-276.
- Yadav A, Garg VK. 2011b. Recycling of organic wastes by employing *Eisenia fetida*. Bioresource Technology **102**: 2874-2880.
- Vaca-Paulín R, Esteller-Albreich MV, Lugo-de Fuente J, Zavaleta-Mancera HA. 2006. Effect of sewage sludge or compost on the sorption and distribution of copper and cadmium in soil. Waste management **26**: 71-81.
- Váchalová R, Borová-Batt J, Kolář L, Váchal J. 2014. Selectivity of ion exchange as a sign of soil quality. Communications in Soil Science and Plant Analysis **45**: 2673-2679.
- Váňa J. 1994. Výroba a využití kompostů v zemědělství. Institut výchovy a vzdělávání ministerstva zemědělství České republiky, Praha
- Vaněk V, Balík J, Pavlíková D, Tlustoš P. 2007. Výživa polních a zahradních plodin. Profi Press s.r.o., Praha. ISBN: 976-80-86726-25-0.
- Vaněk V, Balík J, Černý J, Pavlík M, Pavlíková D, Tlustoš P, Valtera J. 2012. Výživa zahradních rostlin. Academia, Praha. ISBN: 978-80-200-2147-2.
- Wang K, Zhang J, Zhu Z, Huang H, Li T, He Z, Yang X, Alva A. 2012. Pig manure vermicompost (PMVC) can improve phytoremediation of Cd and PAHs co-contaminated soil by *Sedum alfredii*. Journal of Soil and Sediments **12**: 1089-1099.
- Wickström M, Larsson R, Nygren P, Gullbo J. 2011. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. Cancer Science **102**: 501-508.

- Woodbury PB. 1992. Trace elements in municipal solid waste composts: a review of potential detrimental effects on plants, soil biota, and water quality. *Biomass and Bioenergy* **3**: 239–259.
- Yadav A, Garg VK. 2011. Recycling of organic wastes by employing *Eisenia fetida*. *Bioresour. Technol* **102**: 2874–2880.
- Zajonc I. 1992. Chov dážďoviek a výroba vermikompost. Animapress, Povoda. ISBN: 80-85567-00-8.
- Zmora-Nahum S, Markovitch O, Tarchitzky J, Chen Y. 2005. Dissolved organic carbon (DOC) as a parameter of compost maturity. *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 2109-2116.