

**RESISTENCIA DE HONGOS MICORRÍZICOS  
ARBUSCULARES A PERTURBACIONES DE pH Y MATERIA  
ORGÁNICA INDUCIDOS POR LA APLICACIÓN DE VINAZAS  
TEQUILERAS AL SUELO**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN LA  
ESPECIALIDAD DE INGENIERIA AMBIENTAL**

PRESENTA

**I.Q. VALERIA ARENAS MONTAÑO**

GUADALAJARA, JAL. FEBRERO 2017





Guadalajara, Jalisco al 20 de Febrero de 2017

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO  
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO  
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.  
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial la estudiante **Valeria Arenas Montaña** , una vez leída y revisada la Tesis titulada “**RESISTENCIA DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES A PERTURBACIONES DE pH Y MATERIA ORGÁNICA INDUCIDOS POR LA APLICACIÓN DE VINAZAS TEQUILERAS AL SUELO**” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la estudiante para aspirar al grado de Maestro en Ciencia y Tecnología en la opción terminal de Ingeniería Ambiental durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 20 del mes de febrero del año dos mil diecisiete.

Dra. Silvia Maribel Contreras Ramos

*Director de tesis/tutor académico*

Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar

*Co-director de tesis/tutor en planta*

Dr. Gustavo Dávila Vázquez

*Asesor/Asesora*





CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Guadalajara, Jalisco al 28 de Febrero de 2017

CONSEJO GENERAL DEL POSGRADO  
INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del Jurado del Examen de Grado de la estudiante **Valeria Arenas Montaña**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “**RESISTENCIA DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES A PERTURBACIONES DE pH Y MATERIA ORGÁNICA INDUCIDOS POR LA APLICACIÓN DE VINAZAS TEQUILERAS AL SUELO**” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el/la estudiante para aspirar al grado de Maestro en Ciencia y Tecnología en la opción terminal de Ingeniería Ambiental durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 28 del mes de febrero del año dos mil dieciséis.

Dra. Dioselina Álvarez Bernal

*Presidente*

M.C. Laura Hernández Cuevas

*Secretario*

Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar

*Vocal*



## Dedicatoria

A todos los que de alguna manera contribuyeron a este trabajo, llenando el camino de ánimo y alegrías, regalándome paciencia, entendimiento y conocimiento, motivándome a seguir adelante o simplemente escuchándome cuando necesitaba su apoyo.





## Agradecimientos

Quiero agradecer

A mi directora de tesis, la Dra. Maribel Contreras Ramos, por las enseñanzas, por su apoyo desde el primer al último día, por todo el tiempo que dedicó a este proyecto, por su paciencia, comprensión y confianza,

A mis asesores, la Dra. Evangelina Quiñones Aguilar y el Dr. Gustavo Dávila Vázquez, quienes siempre estuvieron dispuestos a resolver mis dudas y por su valiosa aportación en este proyecto,

A mis sinodales, la M. en C. Laura Hernández Cuevas, por su disposición a apoyarme en la identificación taxonómica de HMA y su revisión de este trabajo y a la Dra. Dioselina Álvarez Bernal por su aporte en la revisión de esta tesis,

A Ely y el Dr. Jacobo Rodríguez Campos por la identificación de compuestos fenólicos en las vinazas,

A todos los que me ayudaron con lo que no podía hacer yo sola, las veces que fue necesario cargar sacos, procesar muestras, montar y levantar el experimento, gracias Janet, Yvonne, Luzma, Luis, Mari, René, Lorena, a todos mis compañeros de la Unidad de Tecnología Ambiental, y a Diego por su apoyo durante toda la maestría,

A mi familia y a Tonatiuh por su comprensión, su apoyo y por motivarme a seguir adelante y a ser cada vez mejor,

Al proyecto 181070 del fondo SEP-CONACYT por el financiamiento de este proyecto y a CONACYT por la beca de maestría.



# Tabla de contenido

	<b>Página</b>
Resumen .....	VII
1 Antecedentes .....	1
1.1 ¿Qué son las vinazas? .....	1
1.2 Vinazas tequileras .....	2
1.2.1 Importancia del tequila en Jalisco .....	2
1.2.2 Proceso de producción del tequila .....	3
1.2.3 Estadísticas de generación de bagazo y vinazas .....	5
1.2.4 Características principales de las vinazas .....	6
1.3 Aplicación de vinazas a suelos agrícolas .....	7
1.3.1 Regulación ambiental .....	8
1.3.2 Efectos en el suelo .....	9
1.3.3 Efectos en las plantas .....	10
1.3.4 Efectos en los macro y microorganismos del suelo .....	11
1.4 Hongos micorrízicos arbusculares .....	12
1.4.1 Ciclo de vida de los HMA .....	13
1.4.2 Uso de inóculos de HMA en agricultura .....	14
1.5 Perturbación al hábitat de los HMA .....	16
1.5.1 Materia orgánica .....	16
1.5.2 Compuestos fenólicos .....	16
1.5.3 pH .....	17
1.5.4 Salinidad .....	18
1.5.5 Vinazas y HMA .....	18
2 Justificación .....	21
3 Hipótesis y objetivos .....	23
3.1 Hipótesis .....	23
3.2 Objetivo general .....	23
3.3 Objetivos específicos .....	23
4 Metodología .....	25
4.1 Etapa I. Caracterización del suelo, de la vinaza y del consorcio de HMA .....	25
4.1.1 Muestreo y caracterización del suelo .....	25
4.1.2 Muestreo y caracterización de vinazas tequileras .....	28
4.1.3 Caracterización del consorcio de HMA nativo del suelo agrícola regado con vinazas .....	30
4.2 Etapa II. Propagación de esporas de HMA .....	32
4.3 Etapa III. Ensayo de germinación de sorgo y maíz con vinazas .....	35
4.3.1 Establecimiento del ensayo de germinación .....	35

4.3.2	Evaluación de la germinación de semillas.....	36
4.4	Etapa IV. Experimento en invernadero.....	37
4.4.1	Establecimiento del experimento.....	37
4.4.2	Evaluación del crecimiento de la planta.....	40
4.4.3	Evaluación del suelo.....	40
4.4.4	Evaluación de la simbiosis micorrízica.....	43
4.5	Análisis estadístico.....	45
5	Resultados y discusión.....	47
5.1	Muestreo y caracterización.....	47
5.1.1	Vinazas tequileras.....	47
5.1.2	Suelo agrícola.....	51
5.1.3	Evaluación de los HMA en el suelo.....	53
5.2	Propagación de esporas.....	54
5.2.1	Cuantificación de los HMA propagados.....	54
5.2.2	Abundancia relativa y diversidad de especies de los HMA propagados.....	55
5.3	Efecto de las vinazas sobre la germinación de sorgo y maíz con diferentes concentraciones.....	58
5.3.1	Porcentaje de germinación.....	58
5.3.2	Crecimiento de radícula e hipocótilo.....	59
5.3.3	Efecto de las vinazas en la germinación de semillas.....	60
5.4	Evaluación del experimento en invernadero.....	63
5.4.1	Parámetros del suelo.....	63
5.4.2	Simbiosis micorrízica.....	74
5.4.3	Crecimiento del maíz con el riego de vinazas.....	81
5.4.4	Análisis de varianza.....	87
5.4.5	Análisis multivariado.....	88
6	Conclusiones.....	91
7	Recomendaciones.....	93
8	Bibliografía.....	95
Anexos	.....	107
A.	Especies de HMA identificadas en t3.....	107

## Índice de figuras

	<b>Página</b>
Figura 1. Valor de exportaciones totales de tequila del 2010 al 2016.....	3
Figura 2. Producción de tequila y sus residuos. ....	4
Figura 3. Colonización micorrízica (adaptado de Parniske, 2008).....	14
Figura 4. Aplicación de vinazas tequileras en El Arenal, Jalisco. ....	26
Figura 5. Predio en El Arenal, Jalisco. ....	26
Figura 6. Macetas de propagación de HMA con sorgo y alfalfa al inicio (izquierda) y final (derecha) del experimento. ....	33
Figura 7. Germinación in vitro de maíz (izquierda) y sorgo (derecha) con vinaza al 50%....	36
Figura 8. Crecimiento de plantas de maíz previo al riego de vinazas. ....	39
Figura 9. Densidad de esporas en el conteo inicial y a los seis meses. ....	55
Figura 10. Abundancia relativa de especies en el consorcio El Arenal (arriba) y el propagado (abajo). n=3.....	56
Figura 11. Comparación del porcentaje de germinación de sorgo y maíz con los cuatro tratamientos de vinaza. ....	59
Figura 12. Comparación de la longitud de radícula (cm) de las semillas germinadas de maíz y sorgo con los cinco tratamientos de vinaza. ....	60
Figura 13. Comparación de la longitud del hipocótilo (cm) de las semillas germinadas de maíz y sorgo con los cinco tratamientos.....	60
Figura 14. Macetas regadas con A (izquierda), con 4.5 – 60% (centro) y con 4.5 – 30% (derecha). ....	63
Figura 15. Comparación del pH del suelo con los cinco tratamientos de vinaza (pH 3.5, 4.5, concentración de 30 y 60% y agua) y dos inóculos de HMA en tiempo inicial (t0) y a los tres meses (t3).....	65
Figura 16. Comparación de la conductividad eléctrica del suelo con los cinco tratamientos de vinaza (pH 3.5, 4.5, concentración de 30 y 60% y agua) y dos inóculos de HMA en tiempo inicial (t0) y a los tres meses (t3).....	66
Figura 17. Comparación de la concentración de fosfatos en el suelo con los cinco tratamientos de vinaza (pH 3.5, 4.5, concentración de 30 y 60% y agua) y dos inóculos de HMA en tiempo inicial (t0) y a los tres meses (t3). ....	69
Figura 18. Comparación de la concentración de fenoles totales (eq. ácido gálico) en el suelo con los cinco tratamientos de vinaza (pH 3.5, 4.5, concentración de 30 y 60% y agua) y dos inóculos de HMA en tiempo inicial (t0) y a los tres meses (t3). ....	71
Figura 19. Comparación de la densidad de esporas en el suelo (esporas por 10 g de suelo) con los cinco tratamientos de vinaza (pH 3.5, 4.5, concentración de 30 y 60% y agua) y dos inóculos de HMA en tiempo inicial (t0) y a los tres meses (t3). ....	74
Figura 20. Comparación del porcentaje de colonización micorrízica con los cinco tratamientos de vinaza (pH 3.5 y 4.5, concentración de vinaza 30% y 60%) y dos inóculos de HMA a los tres meses.....	80

Figura 21. Formación de espiga (izquierda) y mazorca (centro); plantas de maíz al finalizar el experimento (derecha) .....	82
Figura 22. Comparación de la altura de planta con los cinco tratamientos de vinaza (pH 3.5 y 4.5, concentración de vinaza 30% y 60%) y dos inóculos de HMA a los tres meses. ....	82
Figura 23. Comparación de la biomasa total de planta (g) con los cinco tratamientos de vinaza (pH 3.5 y 4.5, concentración de vinaza 30% y 60%) y dos inóculos de HMA a los tres meses. ....	84
Figura 24. Raíces de maíz al terminar el experimento de los tratamientos A inóculo I (izquierda), 4.5 – 60% inóculo I (centro), 3.5 – 60% inóculo I (derecha).....	86
Figura 25. Análisis de componentes principales. ....	89

## Índice de tablas

	<b>Página</b>
Tabla 1. Metodologías de caracterización de suelo.....	27
Tabla 2. Metodologías de caracterización de la vinaza tequilera. ....	29
Tabla 3. Tratamientos de riego. ....	38
Tabla 4. Caracterización fisicoquímica de vinazas tequileras. ....	48
Tabla 5. Caracterización fisicoquímica de suelo regado por vinazas. ....	52
Tabla 6. Densidad de esporas de suelo agrícola El Arenal.....	53
Tabla 7. Densidad de esporas por especie del suelo El Arenal e inóculo nativo.....	57
Tabla 8. Riqueza y diversidad de especies del inóculo nativo antes y después de la propagación. ....	57
Tabla 9. Concentración de fenoles totales acumulada por el riego de vinazas en la experimentación.....	72
Tabla 10. Abundancia relativa del inóculo propagado (inoculado) y al final del experimento t3. ....	76
Tabla 11. Densidad de esporas (DE) por especie en t3. ....	77
Tabla 12. Riqueza y diversidad de especies para t3 ....	79
Tabla 13. Análisis de Varianza para todos los factores (Error Tipo III). ....	87
Tabla 14. Correlaciones de Pearson (r) para todos los parámetros estudiados.....	88





# Resumen

Las vinazas son residuos producidos durante la destilación para producir alcohol o bebidas destiladas que se caracterizan por un pH ácido, alta concentración de materia orgánica, alto contenido de sales y de compuestos fenólicos, entre otros. En México y particularmente en Jalisco, la disposición de vinazas de la industria del tequila es un problema ambiental por los grandes volúmenes generados (1,661 millones de litros en 2015) que comúnmente se riegan en campos agrícolas sin una regulación ambiental adecuada. Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son simbiontes obligados de las plantas y algunos estudios reportan que se afectan negativamente por las vinazas, posiblemente por el cambio de pH, la elevada salinidad y la presencia de compuestos fenólicos en los suelos. Sin embargo, no existen reportes de si los HMA presentes en suelos irrigados con vinazas tequileras son resistentes a las condiciones de que éstas generan. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue evaluar la resistencia de los HMA a la acidez y la elevada concentración de materia orgánica inducidos por la aplicación de vinazas tequileras.

Se estableció un experimento en invernadero para comparar la resistencia entre HMA nativos (N) y un inóculo comercial (I) con *Rhizophagus intraradices*. El inóculo N (70.4% de abundancia de *Claroideoglossum etunicatum*) fue extraído de un suelo de cultivo de caña de azúcar donde se irrigan vinazas tequileras regularmente y propagado en macetas trampa. El consorcio (N o I) fue inóculado a plántulas de maíz pre-germinadas (15 días) y se aplicaron cinco tratamientos variando el pH (3.5 y 4.5) y la concentración (30% y 60%) de la vinaza o agua como control: 3.5–30%, 3.5–60%, 4.5–30%, 4.5–60% y agua (A) con seis réplicas por tratamiento. Al inicio (t0) y después de tres meses (t3) se midieron pH, conductividad eléctrica (CE), concentración de fósforo disponible (PO<sub>4</sub>) y de fenoles totales (FT) del suelo, además de la densidad de esporas (DE) y la altura de la planta (H). Además se calcularon la riqueza (R) y la diversidad de especies (D), el porcentaje de colonización (%C) de los HMA y la biomasa total (BT) del maíz al final (t3).

Los resultados indicaron que en comparación con el riego con agua y la condición inicial (t0), la irrigación con vinazas produjo un aumento en el pH ( $p < 0.05$ ) por la descomposición de la materia orgánica y aumentó la CE ( $p < 0.05$ ) del suelo casi al doble en el tratamiento VII

4.5–60%, por la acumulación de sales. Se registró un aumento en FT ( $p < 0.05$ ) en t3 hasta 90 mg/kg de suelo, relacionado con la concentración de la vinaza irrigada.

También se observó una DE menor del inóculo I al aplicar vinaza con respecto al control con agua en t3 ( $p < 0.05$ ), lo cual no se observó para el inóculo N, indicando una mayor resistencia de este último posiblemente debido a una adaptación a las condiciones de irrigación regular con vinazas y a una ventaja por la presencia de varias especies de HMA. El %C del tratamiento 3.5 – 30% fue significativamente menor que el del tratamiento con A con el inóculo I ( $p < 0.05$ ), lo cual no sucedió con el inóculo N, nuevamente demostrando una resistencia de éste inóculo nativo a las condiciones que generan las vinazas. Adicionalmente, únicamente en las plantas inoculadas con I, la H y la BT se afectaron negativamente por la aplicación de vinazas con los tratamientos de 60% de materia orgánica ( $p < 0.05$ ).

Estos resultados indican que sí hay un efecto negativo de la aplicación de vinazas tequileras en la especie de HMA no nativa y las plantas relacionado con la concentración de vinazas. El efecto negativo es menor o no significativo con los HMA nativos. Esto se puede explicar por la acumulación de sales en el suelo, la concentración de compuestos fenólicos tóxicos, un cambio de pH y otros factores no estudiados, como la compactación del suelo y la concentración de otros compuestos presentes en las vinazas como melanoidinas y furfurales. Si bien los factores estudiados en este trabajo mostraron una correlación significativa, pero débil ( $r < 0.3944$ ), no son todos los que pueden estar influyendo en el crecimiento y desarrollo de la planta o en la simbiosis de los HMA; este trabajo permitió demostrar que un inóculo nativo de sitios irrigados con vinazas fue más resistente a los cambios de pH y de materia orgánica de la vinaza, lo cual promueve mayores beneficios para el crecimiento vegetal, expresados en una mayor altura y biomasa en estas condiciones de cultivo.

# 1 Antecedentes

## 1.1 ¿Qué son las vinazas?

El término *vinazas* se utiliza para definir a los efluentes de producción de alcohol. Las vinazas son aguas residuales complejas que se generan durante la producción de etanol a partir de la fermentación de azúcares obtenidos de diferentes fuentes, como caña de azúcar, remolacha, agave (tequila, mezcal), uva (vino), maíz, sorgo, trigo y otros (España-Gamboa *et al.*, 2011). El etanol se produce a partir de la hidrólisis de los azúcares, su fermentación y destilación. En el último paso es en el que se acumulan las vinazas en los fondos de destilación, y es el proceso durante el cual se separa el alcohol de toda la materia orgánica, sales y levaduras que contiene el mosto fermentado.

Entre las vinazas más estudiadas están las de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y de remolacha (*Beta vulgaris*), pero algunos autores como Christofolletti *et al.* (2013) y Moran-Salazar *et al.* (2016) han comparado las características principales reportadas de diferentes vinazas como las de caña de azúcar, remolacha, mezcal, tequila, vino y sorgo, e indicaron que cada tipo de vinaza tiene concentraciones diferentes de fósforo, nitrógeno y micronutrientes. Sin embargo, en general comparten un pH ácido (de 3.9 a 5.1) y una alta concentración de materia orgánica (18,900 a 78,300 mg/L de DBO y 50,000 a 95,000 mg/L de DQO).

Debido a sus características y a la presencia de algunos compuestos recalcitrantes son consideradas aguas residuales complejas y su tratamiento no se puede llevar a cabo de manera convencional (López-López y Contreras-Ramos, 2015). Como consecuencia, se han buscado alternativas como el riego a suelos agrícolas o fertirrigación para disponer de este residuo. Esta práctica se volvió muy común en Brasil como alternativa a la descarga en cuerpos de agua de los grandes volúmenes de vinazas producidos a partir de la creación del

Programa Nacional del Etanol (PROÁLCOOL) que impulsó la producción de etanol como combustible.

En México, principalmente en el estado de Jalisco, la producción de tequila es una actividad económica importante, por lo que la generación y disposición de vinazas en el suelo es un problema ambiental que concierne a la región. Aunque esta práctica es común, no hay una regulación y estudios suficientes para asegurar que no cause efectos adversos en un corto y largo plazo a la calidad y fertilidad de los suelos agrícolas.

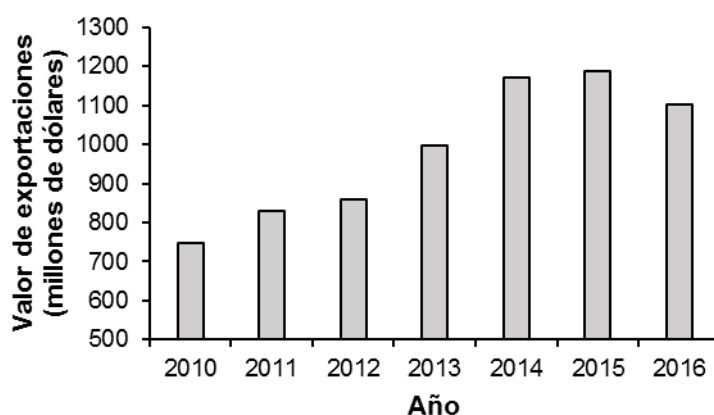
## **1.2 Vinazas tequileras**

### **1.2.1 Importancia del tequila en Jalisco**

La producción de tequila en el estado de Jalisco es de gran importancia económica y cultural, ya que es una bebida tradicional que representa a Jalisco y México en el mundo. Su origen se remonta a épocas prehispánicas, en las que está documentado el uso de plantas de maguey (del género *Agave*) para elaborar alimentos, jugos fermentados y posiblemente destilados, tanto en la región de lo que ahora es Tequila como en diferentes partes de México (Gallardo-Valdez, 2015). Esto dio origen a destilados de agave con diferentes nombres.

El tequila se obtiene a partir del *Agave tequilana* Weber var. Azul (López-López *et al.*, 2010), la cual es una planta endémica de la región. Existen destilados de otras especies de agave en otras regiones del país como el mezcal, el bacanora y el sotol, pero cada uno tiene su denominación de origen propia y se producen a partir de especies de agave diferentes. En 1977 se promulgó la norma oficial mexicana NOM-006-SCFI-2012 (revisada en 2012) que muestra las especificaciones de producción del tequila, así como la región donde se puede producir. Esta región está delimitada por los 125 municipios de Jalisco y 56 municipios de los estados de Michoacán, Guanajuato, Nayarit y Tamaulipas (CRT, 2014a). Se estima que en 2016 se consumieron 941.8 miles de toneladas de agave para la producción de tequila (Consejo Regulador del Tequila, 2016a), siendo éste el quinto cultivo

con mayor superficie sembrada en el estado de Jalisco en 2013 (SIAP-SAGARPA, 2013). En 2016 se obtuvo una producción de tequila de 198.8 millones de litros (al 55%) (Consejo Regulador del Tequila, 2016b), considerando tequila 100% de agave y tequila adicionado con otros azúcares (hasta 49%). De acuerdo con datos estadísticos del Sistema de Información Arancelaria Vía Internet (SIAVI) (2016), ese mismo año se exportaron 159.1 millones de litros de tequila, principalmente a Estados Unidos, con un valor de 1,102.1 millones de dólares. Las ganancias derivadas de las exportaciones han ido en aumento en los últimos años, salvo en el año 2016, como se muestra en la Figura 1.

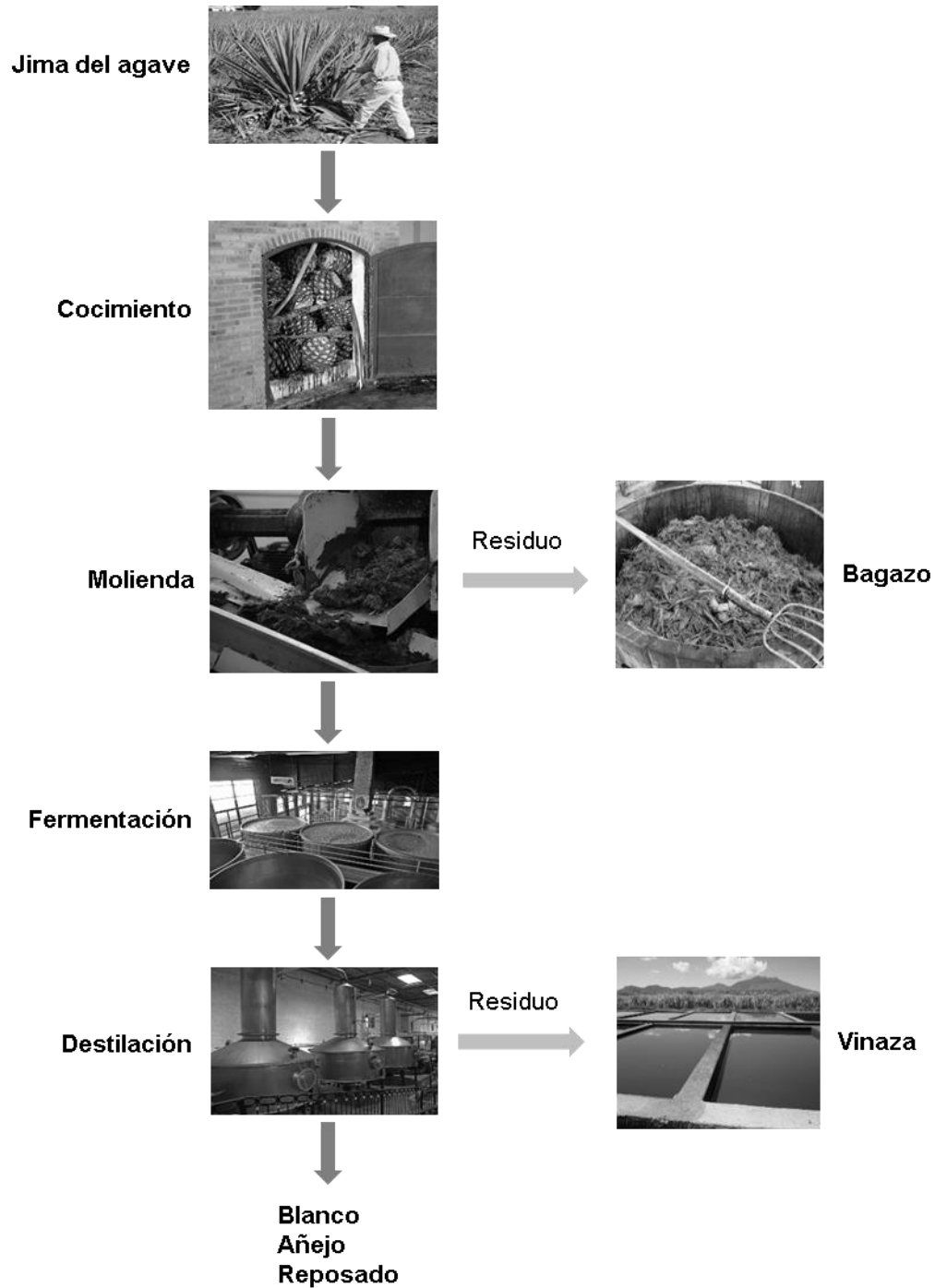


**Figura 1.** Valor de exportaciones totales de tequila del 2010 al 2016. Gráfica generada a partir de la información del SIAVI (2016) para el tequila (22089003).

## 1.2.2 Proceso de producción del tequila

El proceso tradicional de producción del tequila consiste de una de serie pasos en los que se generan diferentes residuos (Figura 2). En primer lugar, se lleva a cabo la jima de las cabezas de agave para su posterior cocimiento. Éste se puede realizar en hornos de mampostería o en autoclave. Las piñas de agave se muelen separando el jugo donde se encuentran los azúcares hidrolizados (mosto), de la fibra o bagazo. Este bagazo es el primer residuo. Después se fermenta el mosto con algunas levaduras seleccionadas y posteriormente, se procede a una doble destilación para separar el alcohol. En el fondo de los alambiques o columnas de destilación se concentran las vinazas como residuo líquido

que contienen restos de materia orgánica, levaduras, sales, agua, entre otros. Finalmente, se puede envasar o almacenar para producir un tequila añejo (Gallardo-Valdez, 2015).



**Figura 2.** Producción de tequila y sus residuos. Elaboración propia con fotografías libres de derechos de autor.

### **1.2.3 Estadísticas de generación de bagazo y vinazas**

En promedio, el 40% del peso de las cabezas de agave que se molieron se convierten en bagazo (Cedeño, 1995), lo cual representa aproximadamente 315.6 miles de toneladas de bagazo producidas en el año 2015. El bagazo se utiliza para la fabricación de ladrillos principalmente, pero se ha propuesto utilizarlo, entre otros, como composta en combinación con la vinaza (Iñiguez *et al.*, 2005).

Por otro lado, la concentración de alcohol después de la fermentación es únicamente del 4 al 9% (Cedeño, 1995), así que gran parte se desecha en las vinazas. La producción de vinazas tiene una relación de aproximadamente 10 L por cada litro de tequila producido (López-López *et al.*, 2010). Por lo tanto, se estima que en el año 2016 fueron producidos 1,988 millones de litros de vinazas.

Por su parte, las vinazas de caña de azúcar se generan en una proporción de 10 a 15 litros por cada litro de etanol producido y sus principales productores son Brasil, India, China, Pakistán, Tailandia y México, por mencionar algunos. Por cada litro de etanol de remolacha se generan entre 9 y 14 litros de vinazas principalmente en Alemania, Francia, Polonia, Reino Unido, Canadá y Estados Unidos, entre otros. En el caso del agave diferente al tequilero, se generan entre 8 y 15 L de vinaza por cada litro de mezcal, únicamente en México. De acuerdo con datos de producción de estos destilados se estima que se produjeron en 2013 alrededor de  $3.36$  a  $6.3 \times 10^7$  litros de vinaza de mezcal (Moran-Salazar, 2015).

Por lo tanto, ambos residuos representan un reto para la industria del tequila, que se ha abordado desde diferentes puntos de vista, desde su tratamiento hasta la generación de valor agregado.

#### 1.2.4 Características principales de las vinazas

Las características de las vinazas tequileras pueden variar en función de las diferencias entre las condiciones de operación del proceso (López-López y Contreras-Ramos, 2015). En general existen dos procesos: el proceso tradicional, en el que se cuecen las piñas de agave en hornos o autoclave y el proceso por difusor, en el que se inyecta agua caliente (a 80 °C aproximadamente) a las fibras provenientes de las piñas crudas para extraer el jugo y posteriormente cocerlo (Pérez Martínez *et al.*, 2015). En el proceso tradicional la composición de las vinazas es más alta en compuestos como furfural, furano y furanona que el proceso por difusor como demostraron Rodríguez-Félix *et al.* (2016). La vinaza estudiada en este trabajo proviene de una tequilera que utiliza el primer proceso, que es el tradicional y más ampliamente usado.

En las caracterizaciones de la vinaza tequilera que se han hecho hasta la fecha, principalmente se reporta, un pH ácido entre 3.4 y 4.5, color café oscuro, alta concentración de materia orgánica y de sólidos suspendidos y disueltos (López-López *et al.*, 2010; Retes-Pruneda *et al.*, 2014).

Las vinazas tienen una coloración café oscuro que puede provenir de la presencia de diferentes compuestos como melanoidinas, fenoles o de la caramelización de los azúcares. Chandra *et al.* (2008) reportaron que las melanoidinas son el principal aportador de color en los efluentes de la producción de alcohol de caña. Estos son productos de las reacciones de Maillard, las cuales se llevan a cabo durante el proceso de cocción. La cocción de las piñas de agave tiene como principal objetivo hidrolizar los fructanos de agave para producir azúcares simples como la fructosa para su posterior fermentación. Sin embargo, la interacción de aminoácidos y proteínas con carbohidratos reductores a altas temperaturas conducen a la formación de los productos de Maillard, entre los que están las melanoidinas como el furfural y el 5-hidroximetilfurfural (Mancilla-Margalli y López, 2016; Pérez Martínez *et al.*, 2015) que dan una coloración café al jugo de agave.

Los compuestos fenólicos presentes en la vinaza también contribuyen a la coloración de la misma. Parnaudeau *et al.* (2008) reportaron que el origen de los compuestos fenólicos depende de la materia prima utilizada para producir las melazas. Las melazas de caña de



azúcar contienen compuestos fenólicos derivados de lignina y las de remolacha contienen compuestos fenólicos derivados de proteínas. Además, reportan que también se pueden originar de las melanoidinas generadas por las condiciones fisicoquímicas del proceso.

Otra característica importante es la alta concentración de materia orgánica medida como 35,000-82,000 mg/L de DBO5 (demanda biológica de oxígeno medido a 5 días) y 60,000-100,000 de DQO (demanda química de oxígeno), la cual está compuesta principalmente por compuestos fenólicos (153 mg/L), lignina, celulosa y melanoidinas. Las vinazas contienen una alta concentración de sólidos totales (25,000-62,145 mg/L) y disueltos (23,000-53,817 mg/L), entre los que se encuentran ácidos orgánicos como oxalato, malato, lactato y acetato reportados por Parnaudeau *et al.* (2008) en vinaza de caña de azúcar, además de sales y iones metálicos como calcio (200-1,100 mg/L), magnesio (100-300 mg/L) y potasio (150-650 mg/L) (López-López *et al.*, 2010; Retes-Pruneda *et al.*, 2014).

### **1.3 Aplicación de vinazas a suelos agrícolas**

Las vinazas tienen un contenido alto de materia orgánica y de compuestos que no están presentes en aguas residuales domésticas o municipales, por lo que no se pueden tratar como aguas residuales convencionales (López-López y Contreras-Ramos, 2015). Como consecuencia, los productores pequeños y medianos de tequila no tienen la solvencia económica para llevar a cabo un adecuado proceso de tratamiento que permita cumplir con los límites permisibles de concentración de contaminantes establecidos en la normatividad de descarga de aguas residuales a cuerpos de agua o a la red de alcantarillado en México (NOM-001-SEMARNAT-1996; NOM-002-SEMARNAT-1996). El límite máximo permisible de DBO5 es de 150 mg/L para descarga en ríos (para uso agrícola el parámetro no está definido para descarga en suelos), lo cual requeriría una reducción de hasta el 99% con respecto a la concentración media de DBO en las vinazas. Sin embargo, algunos de los compuestos presentes en las vinazas son recalcitrantes a los procesos biológicos convencionales de tratamiento de aguas residuales como los lodos activados y no permiten

una descomposición adecuada de la materia orgánica (Íñiguez-Covarrubias y Peraza-Luna, 2007).

Como resultado, aproximadamente el 80% de estas vinazas se descargan directamente a cuerpos de agua, a la red de alcantarillado municipal, o al suelo (Íñiguez *et al.*, 2005; López-López *et al.*, 2010). La aplicación de vinaza a suelos agrícolas es una práctica común porque se piensa que debido a la alta carga orgánica que contiene, podría ser utilizada como fertilizante en el suelo para optimizar la producción agrícola. En Brasil, algunos autores reportan que las vinazas de la industria alcohólica de caña de azúcar se disponían en ríos u otros cuerpos de agua inicialmente y, posteriormente, se comenzaron a utilizar para “fertirrigación”, es decir, en campos agrícolas como fertilizante por su alto contenido de nutrientes (Demattê *et al.*, 2004; Fuess y Garcia, 2014).

Sin embargo, se ha comprobado que su descarga en suelos agrícolas sin un tratamiento previo puede tener un efecto negativo en las características físicas, químicas y biológicas del suelo (ver 1.3.2 Efectos en el suelo), las plantas (ver 1.3.3 Efectos en plantas) y los microorganismos (ver 1.3.4 Efectos en microorganismos) del suelo. Además, puede tener un impacto ambiental significativo como la eutrofización de cuerpos de agua o la pérdida de la fertilidad del suelo (Íñiguez-Covarrubias y Peraza-Luna, 2007).

### **1.3.1 Regulación ambiental**

Brasil, el país con mayor producción de caña de azúcar en el mundo (Christofoletti *et al.*, 2013), es el único donde existe regulación para la fertirrigación de vinazas en campos agrícolas. La norma P4.231 (CETESB, 2006) marca los lineamientos para calcular la dosis permitida de riego de vinaza, únicamente en función de su concentración de  $K_2O$  y la que existe en el suelo.

La norma que regula la disposición de aguas residuales en Estados Unidos es la EPA/600/R-12/618. En ésta se recomiendan el pH, las concentraciones máximas de metales pesados y de otros micronutrientes como flúor, hierro y zinc que debe tener el agua para irrigación de cultivos. Además, la FAO (Food and Agriculture Organization, 1985) publicó directrices de calidad del agua donde se mencionan los niveles de restricción para irrigación

de acuerdo con los efectos que la salinidad, las concentraciones de algunos iones, de nitratos, de bicarbonato y el pH del agua de riego pueden tener en los cultivos.

En México no existe una norma que regule la disposición de vinazas. Por lo tanto, se utilizan las normas aplicables a descargas de aguas residuales en cuerpos de agua o bienes nacionales (NOM-001-SEMARNAT-1996, 1996) y en la red de alcantarillado (NOM-002-SEMARNAT-1996, 1996). En estas normas se definen los límites máximos permisibles de descarga de aguas residuales con respecto a los siguientes parámetros: temperatura, grasas y aceites, materia flotante, sólidos sedimentables, sólidos suspendidos totales, DBO, nitrógeno total, fósforo total, además de metales pesados y cianuros. En la NOM-001 se especifican también los límites máximos permisibles para descarga de aguas residuales en agua para uso agrícola, los cuales son los valores que se utilizan en este trabajo como referencia. Adicionalmente existe la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 (2004) en la cual se definen las concentraciones de referencia en el suelo para la remediación de un sitio; sin embargo, únicamente se consideran los metales pesados como contaminantes. Se puede observar que, a pesar de las regulaciones existentes, no hay un marco normativo que considere los efectos negativos que pueden tener las características particulares de las vinazas para riego en campos agrícolas. Algunos de los metabolitos presentes, como los compuestos fenólicos y las melanoidinas, se han reportado como inhibidores o perturbadores del crecimiento y desarrollo de plantas (John y Sarada, 2012; Li *et al.*, 2010), y de los microorganismos (Báidez *et al.*, 2006; Oksinska *et al.*, 2013; Piotrowski *et al.*, 2008).

### **1.3.2 Efectos en el suelo**

Los efectos de la aplicación de vinazas al suelo pueden ser negativos o positivos y dependen de muchos factores, como el origen de la vinaza, la cantidad aplicada, las características del suelo, etc. (Christofolletti *et al.*, 2013; Da Silva *et al.*, 2007). En general, los efectos adversos que se pueden presentar son debidos a una cantidad excesiva de materia orgánica, de nutrientes y de sales añadidos al suelo (Fuess y Garcia, 2014). Los

estudios que se han realizado están principalmente relacionados con el uso de vinazas de la industria alcoholera de caña de azúcar y de remolacha.

Algunos autores reportan una mejora en las propiedades físicas del suelo, como la densidad aparente, la porosidad y la formación de agregados al agregar vinaza (Hati *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2012) o un incremento en la fertilidad del suelo por el aumento de sustancias húmicas derivadas de la adición de materia orgánica (Canellas *et al.*, 2003).

Por otro lado, Tejada *et al.* (2007) encontraron que la aplicación de vinazas puede tener un impacto negativo en las características físicas del suelo (disminución de la estabilidad estructural, aumento de la densidad aparente). Además, Da Silva *et al.* (2007) encontraron un desbalance en el contenido de elementos importantes para evaluar la fertilidad del suelo como Ca, Mg, K y Na al aplicar sucesivas dosis de vinazas de caña en suelos arenosos, además de una promoción en la capacidad de infiltración del suelo, lo que podría ocasionar contaminación de cuerpos de agua. Las vinazas tienen un alto contenido de sales que ocasionan un mayor o menor aumento en la salinidad del suelo dependiendo, entre otras cosas, de su capacidad de drenado (Madejón *et al.*, 2001).

Debido a que las vinazas tienen un pH ácido, su disposición en el suelo ocasiona que el pH de éste tienda a acidificarse inmediatamente después del riego; sin embargo, se ha encontrado una alcalinización posterior (Da Silva *et al.*, 2007; Laime, 2011), por lo que a largo plazo no existe un proceso de acidificación contraproducente para los cultivos.

Adicionalmente, el proceso de descomposición de las vinazas en el suelo tiene el potencial de generar una gran cantidad de gases de efecto invernadero (GEI). En un estudio con vinaza tequilera se encontró un aumento de emisiones de hasta 22 veces de CO<sub>2</sub>, 767 veces de N<sub>2</sub>O y una disminución de hasta 6.7 veces de CH<sub>4</sub> al regar con vinaza el suelo con respecto al riego con agua. Esto indica una generación de emisiones de GEI de la industria tequilera de entre 0.11 y 0.155 millones de toneladas de CO<sub>2</sub>-C equivalente/año (Moran-Salazar, 2015). Estas emisiones son el resultado de los procesos de descomposición aerobia y anaerobia de la materia orgánica en la vinaza (De Oliveira *et al.*, 2013).

### **1.3.3 Efectos en las plantas**

Se ha encontrado una disminución en la tasa o velocidad de germinación de diferentes especies de plantas como lo mostraron Ale *et al.* (2010). Estos autores encontraron una inhibición en la germinación de semillas de arroz y de trigo al aplicar una concentración del 10% y 25% de vinazas alcoholeras. También Doka *et al.* (2011) observaron una disminución en la tasa de germinación de tres variedades de semillas (*Vigna angularis*, *V. cylindrica* y *Sorghum cernuum*) al aumentar la concentración de vinazas alcoholeras (1-25%); y Ramana *et al.* (2002) encontraron una inhibición de la germinación de jitomate, calabaza, pepino y cebolla dependiente de la dosis de vinaza alcoholera aplicada (inhibición a concentraciones altas de 75 y 100%).

No obstante, el efecto encontrado durante la aplicación de vinazas en los cultivos es contradictorio. Algunos autores (Hati *et al.*, 2007; Soobadar y Ng Kee Kwong, 2012) han encontrado que la aplicación de vinaza a una cierta dosis (3.16 ton/ha y 100 m<sup>3</sup>/ha, respectivamente) puede funcionar como fertilizante para cultivos como soya, trigo y caña de azúcar, produciendo una mejora moderada en el rendimiento o sin diferencias con respecto a una fertilización química. Sin embargo, también existen estudios que reportan un efecto negativo en el rendimiento de cultivos a dosis altas de vinazas (20 y 40 ton/ha) (Tejada y Gonzalez, 2005).

#### **1.3.4 Efectos en los macro y microorganismos del suelo**

Algunos efluentes como los de la industria de tenería han tenido efectos adversos en la actividad microbiana. Al aplicar efluentes de tenería, la biomasa microbiana del suelo no se vio afectada directamente, pero sí se registró una inhibición en la oxidación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, sugiriendo una posible afectación en el funcionamiento biológico del suelo en el ciclo de nitrificación de acuerdo con lo reportado por Alvarez-Bernal *et al.* (2006).

Respecto a la aplicación de vinazas, algunos estudios sugieren que pueden ocasionar cambios o perturbaciones modificando las condiciones del hábitat de microorganismos y fauna (macro y micro) del suelo. Yesilada (1999) encontró una reducción en la fecundidad, en el tiempo de vida y en la supervivencia de la larva de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* al aplicar vinaza alcoholera al suelo y Alves *et al.* (2015) encontraron un

comportamiento evasivo, además de reducción en la reproducción en algunos invertebrados del suelo (lombrices, colémbolos) al aplicar vinazas alcohólicas.

En un estudio con vinaza de remolacha, Tejada *et al.* (2007) encontraron un impacto negativo en las propiedades biológicas (disminución de la biomasa microbiana, de la respiración y de la actividad enzimática) del suelo. Asimismo, Santos *et al.* (2008) observaron una supresión en el crecimiento de hongos patógenos (*in vitro*) a bajas concentraciones de vinaza de remolacha y de caña de azúcar. Otro grupo de microorganismos que se ha visto afectado negativamente por la aplicación de vinazas son los hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Esta perturbación podría reducir su densidad y biodiversidad. Los HMA son importantes ya que son beneficiosos en el crecimiento de los cultivos, mejoran la eficiencia de suministro de nutrientes, protegen contra estrés biótico y abiótico, entre otros beneficios. Sus características, aportación en la agricultura y efectos posibles por la aplicación de vinazas se abordarán en la siguiente sección.

## **1.4 Hongos micorrízicos arbusculares**

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son organismos del suelo de particular interés ya que forman una simbiosis benéfica con la mayoría de las plantas penetrando en sus raíces (endomycorriza). Esta simbiosis tiene beneficios tanto para la planta hospedera como para el hongo ya que mejora la eficiencia de suministro de nutrientes (principalmente fósforo) y agua (Parniske, 2008); también se ha reportado la mejora en la adquisición de nitrógeno (Hodge y Storer, 2015) que tiene como consecuencia una mejora en el crecimiento de las plantas, además de una mayor resistencia a estrés biótico y abiótico (Bonfante y Anca, 2009; Parniske, 2008; Siddiqui y Pichtel, 2008) por lo que recientemente se han empezado a usar como biofertilizantes en cultivos agrícolas.

### 1.4.1 Ciclo de vida de los HMA

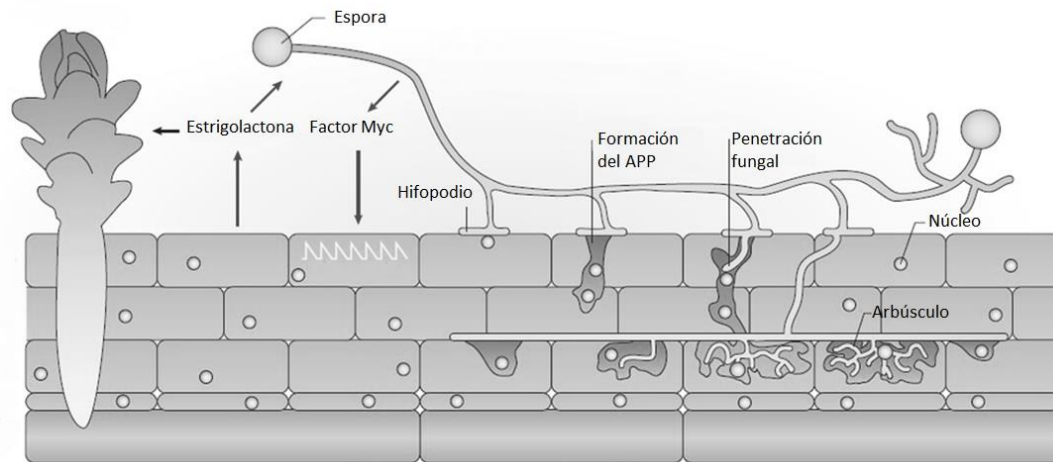
Se ha encontrado que los HMA están ampliamente distribuidos en todo el mundo, que aproximadamente colonizan el 80% de las plantas terrestres (Bonfante y Desiró, 2015) y que existen desde hace más de 400 millones de años sin alteraciones morfológicas mayores (Parniske, 2008). Estos hongos se consideran simbioses obligados y forman una endomicorriza, lo que quiere decir que, al llevar a cabo la simbiosis con las plantas, penetran en su raíz y no se mantienen en la superficie como los hongos ectomicorrízicos. Los HMA pertenecen a la división Glomeromycota y están conformados por un aproximado de 250 especies en 25 diferentes géneros; sin embargo, hay evidencia que señala que la diversidad de especies es aún mucho mayor (Bonfante y Desiró, 2015; Redecker *et al.*, 2013).

Los HMA se encuentran presentes en el suelo como micelio y en forma de esporas, las cuales son órganos asexuales que contienen cientos de núcleos cada una (Parniske, 2008). Las esporas germinan originando hifas que se extienden formando un micelio en el suelo. Se han identificado algunos exudados de las plantas que sirven como señalizadores para los HMA, de manera que estos encuentran a las raíces y las colonizan, entre los que se puede mencionar principalmente a las estrigolactonas (Bucher, 2007).

Una vez establecida la simbiosis comienza el intercambio de nutrientes. La micorriza entrega a la planta nutrientes, principalmente fósforo y nitrógeno, además de agua. La planta, a cambio, provee de carbohidratos al hongo para que pueda continuar su desarrollo. Los sitios de intercambio de nutrientes en la planta son principalmente los arbuscúlos, que dan su nombre a los hongos micorrízicos arbusculares; dichas estructuras tienen forma de árboles ramificados dentro de las células de la raíz. Estas estructuras son exclusivas de los HMA y tienen un tiempo de vida muy corto, con lo que se asegura su máxima eficiencia de intercambio (Parniske, 2008). Además, se pueden formar vesículas, las cuales sirven principalmente para almacenar los nutrientes. Este proceso de colonización de las raíces está representado en la Figura 3. Colonización micorrízica

En la parte extra radical se encuentran el micelio y las esporas. Las hifas toman los nutrientes del suelo y son capaces de extenderse hasta unos 100 metros en un centímetro

cúbico de suelo (Miller *et al.*, 1995). Adicionalmente, segregan una proteína denominada glomalina que ayuda en la formación de agregados en el suelo y mejorar su estructura (Wright y Upadhyaya, 1998).



**Figura 3.** Colonización micorrízica (adaptado de Parniske, 2008).

El ciclo de vida de los HMA que consiste en la germinación de esporas, el crecimiento de hifas, la colonización, el crecimiento hifal extrarradical y la esporulación toman un tiempo variable dependiendo de la especie pudiendo ir desde cuatro meses (*Glomus sensu lato*), ocho meses (*Scutellospora reticulata*) hasta más de doce (*Gigaspora margarita* y *G. rosea*) de acuerdo con De Souza *et al.* (2005). La maduración de nuevas esporas es un proceso que tarda entre 30 y 60 días de acuerdo con Marleau *et al.* (2011) y la fase de esporulación puede durar entre dos y doce meses (De Souza *et al.*, 2005).

### 1.4.2 Uso de inóculos de HMA en agricultura

Con el reciente impulso a métodos agrícolas menos dañinos al ambiente ha surgido el uso de inóculos de HMA en la agricultura sustentable. Los beneficios de los HMA van más allá del suministro de nutrientes a la planta, también existen efectos positivos asociados con el control de plagas, mejora a la resistencia de estrés abiótico (sequía, salinidad, metales pesados), mejora de la calidad del suelo por la formación de agregados (Nasim, 2012) y en



la proliferación de microorganismos rizosféricos benéficos para los cultivos (Bonfante y Anca, 2009). Sin embargo, algunas prácticas comunes en la agricultura como el arado y la fertilización fosfatada son contraproducentes para los HMA (Jansa *et al.*, 2006).

La producción de HMA a gran escala se lleva a cabo por medio de diferentes técnicas, principalmente cultivo en suelo, hidropónico o *in vitro* (Ijdo *et al.*, 2011). Su propagación no es posible en ausencia de una planta hospedera, lo que dificulta su reproducción. Además, existe la posibilidad de introducir otros microorganismos en el inóculo de HMA o que se comiencen a repartir especies exóticas de HMA en el mundo con los riesgos que eso puede representar (Pringle *et al.*, 2009).

Actualmente no existe una legislación que regule la calidad que debe tener un inóculo de HMA para su venta, lo que ocasiona que no todos los productos que se comercializan contengan la cantidad o viabilidad de propágulos que se describe. Se han realizado algunos estudios para evaluar la viabilidad o el funcionamiento de algunos inóculos comerciales y muchos de ellos han tenido un desempeño muy pobre (Rowe *et al.*, 2007; Tarbell y Koske, 2007). En otros casos han resultado ser muy eficientes incluso al ser comparados con un inóculo nativo (Quiñones-Aguilar *et al.*, 2015). Las condiciones en las que se propaga un inóculo comercial son muy controladas, ya que normalmente se realiza en invernadero, y son las más adecuadas para la propagación de los HMA. En campo, las condiciones son muy distintas (temperaturas extremas, competencia con otras especies, condiciones particulares del sitio, etc.) y es posible que al utilizarse en campo dicho inóculo no tenga el mismo desempeño que en invernadero.

Por otra parte, se ha visto en casos aislados que los HMA pueden tener un efecto negativo en el crecimiento de la planta hospedera cuando hay alta disponibilidad de fosfatos o en otras condiciones adversas (Koide y Mosse, 2004). Además, aunque se considera que los HMA no son específicos al hospedero, sí se presenta una cierta afinidad para ciertas plantas, por lo que es importante realizar pruebas de manera extensiva antes de utilizar un inóculo para un nuevo cultivo.

## **1.5 Perturbación al hábitat de los HMA**

### **1.5.1 Materia orgánica**

Algunos estudios han reportado que la aplicación de materia orgánica (en diversas formas) al suelo tuvo efectos positivos sobre las poblaciones de HMA. Bilalis y Karamanos (2010) encontraron una mayor colonización por HMA en maíz al aplicar composta de algas marinas y abono de ganado comparado con una ausencia de fertilización. Gryndler *et al.* (2006) también encontraron un mayor crecimiento de HMA (biomasa del micelio) al utilizar fertilización orgánica. Manibhushanrao (1996) observaron un aumento en la densidad y colonización por HMA en plantas de arroz enfermas (podredumbre de la vaina) al aplicar enmiendas orgánicas. Además, Gryndler *et al.* (2009) observaron que cuando se aplicó materia orgánica en descomposición al suelo, la longitud de raíz colonizada y micelio presentaron mayor crecimiento que cuando no se aplicó ningún aditivo.

Sin embargo, también se han encontrado efectos negativos en el desarrollo de HMA al aplicar materia orgánica. Por ejemplo, al aplicar composta al suelo en dosis altas (50 t/Ha), Cavagnaro (2014) encontró una disminución significativa en la colonización por HMA en plantas de tomate (pero un aumento en el crecimiento de la raíz). Asimismo, Avio y Giovannetti (1988) observaron una inhibición de la colonización micorrízica al aplicar celulosa y Ravnskov *et al.* (1999) reportaron una disminución en el crecimiento del micelio al aplicar almidón y celulosa como fuentes de carbono, pero un aumento al utilizar levadura y albúmina de suero bovino; además, la adquisición de fósforo por parte de los HMA también disminuyó en los tratamientos con celulosa.

### **1.5.2 Compuestos fenólicos**

Se ha observado que algunos compuestos fenólicos pueden tener efectos inhibitorios en el crecimiento de las micorrizas. Boufalis y Pellissier (1994) encontraron una reducción en la

respiración de dos especies de ectomicorrizas al aplicar mezclas fenólicas a una baja concentración ( $10^{-7}$  M) presentes en sustancias húmicas naturales generadas en bosques de abetos. Otros experimentos con compuestos fenólicos no flavonoides mostraron inhibición en el crecimiento hifal de *Rhizophagus fasciculatus* (citado como *Glomus fasciculatum*) o una inhibición en la colonización de la micorriza con ácido ferúlico producido por el espárrago (Wacker *et al.*, 1990). Sin embargo, se ha observado que muchos compuestos flavonoides (quercetina, miricetina y kaempferol, entre otros) pueden estimular la germinación de esporas y el crecimiento hifal (Bécard *et al.*, 1992).

### 1.5.3 pH

Otro factor importante en el crecimiento y colonización por HMA es el pH. A un pH de 4 o menos existe una germinación de esporas despreciable y a medida que aumenta el pH de 7 a 9 también hay una disminución en la germinación de esporas, lo que indica que a pH extremo pocas especies presentan actividad (Green *et al.*, 1976). Green y colaboradores estudiaron la germinación de esporas de tres especies de HMA en un intervalo de pH de 4 a 9 y encontraron que cada especie presentó un valor máximo de germinación a diferente pH, dependiente de la temperatura (15, 25 y 34 °C). Van Aarle *et al.* (2002) estudiaron la respuesta de los HMA al someterlos a distintos pH (5 y 6), y encontraron que se produjo un efecto diferente en el micelio y la colonización de raíces con cada especie. Algunos ejemplos de especies reportadas por sobrevivir en condiciones ácidas son: *Acaulospora* sp., *Gigaspora* sp., *Rhizophagus manihotis* (citado como *Glomus manihotis*) (Clark, 1997) y *Acaulospora laevis* a pH de 4.5 a 4.9 (Porter *et al.*, 2013) y *Acaulospora colombiana* (citada como *Entrophospora colombiana*) (pH < 5.5) (Sieverding *et al.*, 1991); mientras que algunas especies encontradas en condiciones alcalinas son: *Glomus* sp., *Funneliformis caledonium* (citado como *G. caledonium*), *Paraglomus albidum* (citado como *G. albidum*) y *Scutellospora calospora* a 7.5 de pH (Wang *et al.*, 1993).

#### 1.5.4 Salinidad

La salinidad en el suelo puede tener un efecto negativo en las plantas y/o los microorganismos. Esto resulta de la escasez de agua, de una pérdida del balance de iones y de toxicidad en la célula por acumulación de iones (Evelin *et al.*, 2009). También se ha reportado una disminución en el crecimiento hifal o ausencia de germinación de HMA en medio salino, aunque con diferente efecto dependiendo de la especie (Campagnac y Khasa, 2014). No obstante, se han encontrado HMA en condiciones de salinidad e incluso una promoción del crecimiento de las plantas por los HMA en estas condiciones (Estrada *et al.*, 2013). Esto sugiere que el efecto negativo o nulo que tiene la salinidad en el desarrollo de HMA es dependiente de la especie.

#### 1.5.5 Vinazas y HMA

Los pocos estudios en los que se han evaluado las poblaciones de micorrizas al aplicar vinazas (alcoholeras de caña de azúcar) al suelo indican resultados contradictorios. Pereira Aleixo *et al.* (2014) no encontraron diferencias en la densidad de esporas de HMA entre cultivos de caña de azúcar regados con vinaza y los que no fueron regados con vinazas. Por otro lado, Montenegro-Gomez (2008) encontró una inhibición en la colonización por HMA al aplicar un tratamiento de vinaza como fertilizante y solamente algunas esporas del género *Gigaspora* estuvieron presentes, mientras que Velasquez y Sanchez (2011) encontraron un incremento en la actividad biológica de hongos micorrízicos (longitud de micelio externo) al aplicar vinaza como fertilizante. Los últimos dos estudios fueron realizados en plantas de maíz.

En un estudio previo a este trabajo se encontraron esporas de HMA en suelos agrícolas donde se aplican vinazas tequileras periódicamente durante la época de producción del tequila, pero también una disminución en la densidad de esporas con riegos continuos de vinazas en plantas de *Chlorophytum comosum* (Sánchez-Lizárraga, 2015a). Las especies predominantes después del riego de vinaza fueron *Acaulospora mellea*, *A. scrobiculata*, *Funneliformis mosseae* y *Paraglomus occultum*. Esto sugiere que algunos de estos HMA

pueden tener cierta resistencia a condiciones de perturbación por las vinazas tequileras como pueden ser una alta carga orgánica y un pH ácido, entre otros. En este trabajo se entiende por resistencia la capacidad de las plantas o HMA de no mostrar un efecto adverso en su desarrollo por las condiciones de perturbación inducidas por las vinazas, esto no quiere decir que a condiciones más extremas puedan seguir siendo resistentes. No se ha evaluado el efecto de estos parámetros de la vinaza sobre los HMA.



## 2 Justificación

No existen reportes de la resistencia de los HMA a pH ácidos y a una elevada concentración de materia orgánica en los suelos como producto de la irrigación con vinazas tequileras, tan sólo un estudio previo muestra que hay una disminución en la densidad de esporas en un suelo regado con vinazas tequileras. Estudios con otro tipo de vinazas sugieren que la aplicación de vinazas (alcoholeras, vinícolas y/o tequileras) a los suelos agrícolas tiene el potencial de ocasionar cambios y perturbaciones en el suelo, lo cual puede afectar las poblaciones y el desarrollo de hongos micorrízicos benéficos para los cultivos. Los HMA que sobreviven a estas condiciones de pH y materia orgánica podrían ser resistentes a estas condiciones, las cuales podrían ser utilizadas para cultivos o suelos donde estas condiciones predominen para mejorar la resistencia de las plantas a las condiciones de perturbación.





# 3 Hipótesis y objetivos

## 3.1 Hipótesis

Los hongos micorrízicos arbusculares que se encuentran en un suelo donde se han aplicado vinazas tequileras frecuentemente, son resistentes a las condiciones de perturbación producidas por tal aplicación, como la acidez y una elevada concentración de materia orgánica.

## 3.2 Objetivo general

Evaluar la resistencia de los HMA a la acidez y a una elevada concentración de materia orgánica inducidos por la aplicación de vinazas tequileras.

## 3.3 Objetivos específicos

- Aislar e identificar las esporas de HMA presentes en un suelo perturbado por la aplicación de vinazas tequileras.
- Evaluar la resistencia del consorcio de HMA aislado de suelos con vinaza a perturbaciones de acidez y materia orgánica comparado contra un inóculo comercial por medio del conteo de esporas y determinación de la colonización micorrízica de una planta de maíz.
- Evaluar el crecimiento de la planta de maíz cultivada con HMA de suelos con vinaza y comparado con un inóculo comercial, con riegos de vinaza periódicos.
- Evaluar los cambios ocasionados en los principales parámetros del suelo en el cultivo de maíz regado con vinazas periódicamente.



# 4 Metodología

La estrategia experimental se desarrolló en cuatro etapas. En la Etapa I se realizó el muestreo y caracterización del suelo y la vinaza a utilizar en el experimento. También se evaluó el consorcio de HMA en el suelo regado con vinazas. Este consorcio de HMA se propagó en macetas, en invernadero, durante la Etapa II. Al mismo tiempo se realizó la Etapa III, en la que se evaluó *in vitro* el efecto de diferentes dosis de vinazas tequileras en la germinación de posibles plantas hospederas y se escogió una a utilizar en la siguiente etapa. Finalmente, en la Etapa IV se realizó un experimento en invernadero donde se inoculó el consorcio propagado (Etapa II) y uno comercial en macetas, en invernadero, con la planta seleccionada (Etapa III) y se evaluó el efecto en la planta, el suelo y la simbiosis micorrízica a diferentes dosis y niveles de pH de vinazas agregados al suelo.

## 4.1 Etapa I. Caracterización del suelo, de la vinaza y del consorcio de HMA

### 4.1.1 Muestreo y caracterización del suelo

Se realizó un muestreo de suelo agrícola para el establecimiento del experimento y su caracterización fisicoquímica. El suelo agrícola utilizado en el experimento se recolectó en febrero de 2015 en un cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y se escogió porque este sitio ha sido perturbado por la aplicación de vinazas tequileras desde aproximadamente 5 años previos al muestreo (Figura 4). El predio se encuentra en el municipio El Arenal, Jalisco (20° 46' 7'' N y 103° 41' 18'' O) en la región del Volcán de Tequila y la extensión muestreada cubre un área de 2.4 hectáreas dividida en tres secciones (en adelante S1, S2 y S3).

Las vinazas se descargan normalmente a las pilas mostradas en la Figura 5 para disminuir su temperatura y posteriormente se descargan en el canal próximo a S3. Durante la visita se indicó que también se riegan las vinazas directamente de una pipa sobre las secciones S1 y S2, sin enfriamiento previo.



**Figura 4.** Aplicación de vinazas tequileras en El Arenal, Jalisco.



**Figura 5.** Predio en El Arenal, Jalisco. Google Earth® (13 de enero de 2015).

**Tabla 1.** Metodologías de caracterización de suelo.

<b>Parámetro</b>	<b>Metodología</b>	<b>Equipo</b>
Tipo de suelo	Mapa INEGI <a href="http://gaia.inegi.org.mx/mdm6/">http://gaia.inegi.org.mx/mdm6/</a>	N.A.
pH	NOM-021 método AS-02	Medidor Hanna Instruments HI 3512 con electrodo HI 1230
Conductividad eléctrica	NMX-109 método 8.2	Medidor Hanna Instruments HI 3512 con electrodo HI 76310
Capacidad de retención de agua	Methods of soil analysis parte 4.3.3	N.A.
Humedad	NOM-021 método AS-05	Termobalanza AND MF-50
Capacidad de intercambio catiónico	NOM-021 método AS-12	N.A.
% de cenizas	NMX-109 método 8.4	Horno Prendo MF3
% de arena	NOM-021 método AS-09	N.A.
% de arcilla	NOM-021 método AS-09	N.A.
% de limo	NOM-021 método AS-09	N.A.
Clasificación textural	NOM-021 método AS-09	N.A.
Fósforo disponible	Extracto de AS-10 en NOM-021 Procedimiento colorimétrico Hanna® Fosfato Rango Alto	Fotómetro multiparamétrico Hanna Instruments HI 83200
Fósforo total	Digestión con agua regia Procedimiento colorimétrico Hanna® Fósforo	Fotómetro multiparamétrico Hanna Instruments HI 83200
Carbono orgánico total	NMX-109 método 8.5	N.A.
Materia orgánica	NMX-109 método 8.6	N.A.
Nitritos	Extracción con K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Procedimiento colorimétrico Hanna® Nitritos Rango Bajo	Fotómetro multiparamétrico Hanna Instruments HI 83200
Nitratos	Extracción con K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Procedimiento colorimétrico Hanna® Nitratos	
Amonio	Extracción con K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Procedimiento colorimétrico Hanna® Amonio Rango Medio	
Nitrógeno total	Methods of soil analysis, método Kjeldahl. Realizado por el Centro de Estudios y Proyectos Ambientales (CEPA) UdeG	N.A.
Metales pesados: Plomo, cadmio, níquel, hierro, manganeso, zinc y cobre	USEPA 6010B Realizado por la Unidad de Servicios Analíticos y Metrológicos de CIATEJ	Espectrómetro de emisión atómica inductivamente acoplado a plasma (ICP-OES)
Fenoles	Extracto por (Muscolo <i>et al.</i> , 2013) APHA (1999) Método 5550 Folin-Ciocalteu	Espectrofotómetro Hach DR 2800

N.A.: significa no aplica.

Se recolectaron de las tres secciones un total de 300 kg de suelo para el experimento (en adelante suelo El Arenal) y los análisis necesarios a partir de 79 puntos de muestreo. Esto

fue suficiente para cubrir lo requerido por la norma mexicana (NMX-AA-132-SCFI-2006) para muestreo de suelos.

El suelo se mezcló y tamizó por una malla de 5 mm. Cada suelo (S1, S2 y S3) se caracterizó fisicoquímicamente por triplicado de acuerdo con los parámetros, metodologías y equipos señalados en la Tabla 1. Siempre que fue posible se utilizaron las metodologías sugeridas en la NOM-021-SEMARNAT-2000 (2000) o como alternativa se utilizó la NMX-FF-109-SCFI-2007 (2007) y el manual de Métodos de Análisis de Suelos (Mattigod y Zachara, 1996) o la EPA 6010B.

#### **4.1.2 Muestreo y caracterización de vinazas tequileras**

Por otra parte, se realizaron dos muestreos de vinazas de dos tequileras de Jalisco que utilizan un proceso tradicional para la producción de tequila. El proceso tradicional se refiere al cocimiento de las piñas de agave en hornos de mampostería o en autoclave y no utilizando la tecnología de difusor, la cual produce una vinaza con características distintas. Las vinazas se tomaron directamente de la línea de descarga después de la destilación.

Se realizaron dos muestreos de cada tequilera en diferentes tiempos mientras se producía tequila 100% de agave. La vinaza no se pudo recolectar de la misma tequilera ya que no se produce tequila todo el año y por lo tanto no había vinaza disponible durante todo el desarrollo del experimento.

En el primer muestreo, las vinazas tequileras fueron caracterizadas fisicoquímicamente de acuerdo con todos los parámetros de la Tabla 2. Las vinazas recolectadas posteriormente únicamente se caracterizaron de acuerdo a los parámetros señalados por asterisco (\*) por ser los más significativos para el desarrollo del experimento. Los análisis se realizaron por triplicado de acuerdo a las metodologías propuestas por la American Public Health Association (APHA) *et al.* (1999).

**Tabla 2.** Metodologías para la caracterización de la vinaza tequilera.

<b>Parámetro</b>	<b>Metodología</b>	<b>Equipo</b>
pH*	APHA (1999) Método 4500-H <sup>+</sup>	Medidor Hanna Instruments HI 3512 con electrodo HI 1230
Conductividad eléctrica*	APHA (1999) Método 2510	Medidor Hanna Instruments HI 3512 con electrodo HI 76310
Fósforo disponible*	Hanna® Fosfato Rango Alto basado en APHA (1992) método del amino ácido	Fotómetro multiparamétrico Hanna Instruments HI 83200
Fósforo total	Hanna® Fósforo	Fotómetro multiparamétrico Hanna Instruments HI 83200
Carbono orgánico total	TNT Hach COT MR	Espectrofotómetro Hach DR 2800 Digestor Hach
Nitritos*	Hanna® Nitritos Rango Alto basado en el método	Fotómetro multiparamétrico Hanna HI 83200
Nitratos*	Hanna® Nitrato basado en el método de la reducción de cadmio	Fotómetro multiparamétrico Hanna HI 83200
Amonio*	Hanna® Amonio Rango Medio basado en	Fotómetro multiparamétrico Hanna HI 83200
Nitrógeno total	Hach HR Test n'Tube HR. Método de la digestión de persulfato	Espectrofotómetro Hach DR 2800
Demanda química de oxígeno	Hach TNT822	Espectrofotómetro Hach DR 2800
Demanda bioquímica de oxígeno*	Método estándar Hach	Hach BOD Track™ II Incubadora Prendo INO 650V-9
Sólidos totales	APHA (1999) Método 2540 B	Estufa QL Quincy Lab Inc. 40 GC
Sólidos suspendidos totales	APHA (1999) Método 2540 D	Estufa QL Quincy Lab Inc. 40 GC
Sólidos suspendidos volátiles	APHA (1999) Método 2540 E	Horno Prendo MF3
Sólidos volátiles totales	APHA (1999) Método 2540 E	Horno Prendo MF3
Sólidos disueltos totales	APHA (1999) Método 2540 C	Estufa QL Quincy Lab Inc. 40 GC
Sólidos sedimentables	APHA (1999) Método 2540 F	N.A.
Metales pesados: Arsénico, Cadmio, Cobre, Cromo, Mercurio, Plomo, Níquel, Zinc, Hierro	EPA 6010B Realizado por la Unidad de Servicios Analíticos y Metrológicos de CIATEJ	Espectrómetro de emisión atómica inductivamente acoplado a plasma (ICP-OES)
Iones (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )	(Sánchez-Lizárraga, 2015a)	Cromatógrafo de iones
Fenoles*	APHA (1999) Método 5550 Folin-Ciocalteu	Espectrofotómetro Hach DR 2800

\*Parámetros analizados en todas las vinazas; N.A.: significa no aplica.

### **4.1.3 Caracterización del consorcio de HMA nativo del suelo agrícola regado con vinazas**

Los HMA presentes en el suelo El Arenal son especies que presuntivamente han sido resistentes a la aplicación continua de vinazas desde al menos 5 años antes del estudio. Las especies encontradas podrían ser resistentes a las condiciones de perturbación del suelo ocasionadas por la aplicación crónica de vinazas: acidificación, incrementos de materia orgánica, de sales y de temperatura, entre otros. Por lo tanto, era importante hacer una cuantificación de las esporas presentes en el suelo e identificar a las especies que conformaban el consorcio.

#### **4.1.3.1 Aislamiento y cuantificación de los HMA**

Se realizó el aislamiento y cuantificación de esporas de hongos micorrízicos de acuerdo con el método de Brundrett *et al.* (1994). A una muestra de suelo (10 g) se agregó suficiente agua para agitar y disgregar el material. La muestra se dejó sedimentar y se decantó sobre una serie de mallas de 45  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$  y 600  $\mu\text{m}$  (W.S. Tyler® No. 325, 200 y 30, respectivamente). Estas mallas eran las más adecuadas en cuanto al tamaño de esporas que producen los HMA. Posteriormente, se recolectó el material retenido y se centrifugó a 2500 rpm por cinco minutos en una centrífuga Hettich Rotina 380 (Alemania). El sobrenadante se descartó y se volvió a centrifugar cada muestra con sacarosa al 50% por un minuto. En este último paso se recogió el sobrenadante en la malla de 45  $\mu\text{m}$  y se colocó en cajas Petri. Las esporas aisladas se cuantificaron utilizando un estereomicroscopio VELAB VE-S5c (ocular WF10x/20) con un aumento de 4.5x o menor y se extrajeron.

#### **4.1.3.2 Identificación morfológica de las especies de HMA**

Las esporas de HMA obtenidas en el suelo de estudio, en el inóculo propagado y durante el experimento se clasificaron taxonómicamente con base en sus características morfológicas en el Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala por medio de la colaboración con la M. en C. Laura Hernández Cuevas, taxónoma de HMA.



La identificación de las especies de HMA se llevó a cabo analizando en un microscopio óptico con contraste de interferencia de Nomarski (Nikon Optiphot-II) las características morfológicas de las esporas (color y tamaño de la espora, cantidad, espesor y reacción ante el reactivo de Melzer de las capas en la pared de la espora, ornamentaciones, etc.), las que se compararon y contrastaron con las descripciones de especies y/o enlaces a descripciones que aparecen en la páginas web siguientes: International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) (<http://invam.wve.edu/>), Universidad de West Virginia, Estados Unidos; Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Glomeromycota), *Endogone* and *Complexipes* species deposited in the Department of Plant Pathology, University of Agriculture in Szczecin, Prof. Janusz Blaszkowski (<http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/>), Polonia y AMF-Phylogeny (<http://www.amf-phylogeny.com/>) del Prof. Arthur Schüßler, Universidad Ludwig-Maximilians de Munich, Alemania.

#### 4.1.3.3 Abundancia relativa, riqueza e índice de diversidad de especies

La abundancia relativa de cada especie se calculó una vez realizada la identificación morfológica. Se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$AR_i = \frac{n_i}{n_T} \times 100\%$$

Donde  $AR_i$  es la abundancia relativa de la especie  $i$ ,  $n_i$  es el número de individuos de la especie  $i$  presentes en la muestra y  $n_T$  es el número total de individuos en la muestra.

La riqueza de especies se definió como la cantidad de especies diferentes presentes en una muestra de suelo (Spellerberg y Fedor, 2003).

Por último, se calculó el índice de diversidad para comprobar si la aplicación de vinazas tiene un efecto en la diversidad del consorcio micorrízico. A diferencia del cálculo de riqueza de especies, la diversidad es una medida de la heterogeneidad de la distribución de la abundancia de las especies en una muestra (Magurran, 2004).

Uno de los índices de diversidad más comúnmente empleados es el de Shannon-Wiener, el cual combina el componente de la riqueza con la uniformidad, suponiendo que todas las especies están representadas en la muestra; se calcula de la siguiente manera (Shannon, 2001):

$$H' = -\sum p_i \ln p_i$$

Donde  $p_i$  es la proporción de individuos de la especie  $i$ -ésima.

El uso de este índice permite su comparación con otros trabajos (Del Val *et al.*, 1999) en los cuales se ha analizado el impacto de un estrés abiótico en la diversidad de especies de HMA, en este estudio se trató del efecto de la aplicación de la vinaza.

## 4.2 Etapa II. Propagación de esporas de HMA

Se realizó la propagación de esporas contenidas en el suelo de El Arenal con el objetivo de obtener una cantidad suficiente para inocular 60 macetas con un mínimo de 60 esporas por maceta para evaluar su resistencia a diferentes condiciones de aplicación de vinazas.

La propagación de esporas de HMA se realizó *in vivo* en macetas trampa (Figura 6) por triplicado utilizando semillas de sorgo (híbrido sorgo-pasto sudán) y alfalfa (*Medicago sativa*) disponibles comercialmente. Se utilizaron estas dos especies de plantas para promover la germinación de distintas especies dado que la primera es una gramínea (igual a caña de azúcar de donde provenía el consorcio) y la segunda es una leguminosa. Ambas son altamente micorrizables y han sido utilizadas con éxito para la propagación de HMA (Corkidi *et al.*, 2008; Sánchez-Lizárraga, 2015a).

Las semillas fueron desinfectadas con cloro al 10% y colocadas a poca profundidad en el sustrato. El sustrato para las macetas trampa fue una capa inferior de arena estéril, seguida de una capa de suelo El Arenal (S1, S2 o S3) y una capa superior de arena estéril en una proporción de 2:1:1. De esta manera, al crecer las raíces de las plantas se encontrarían con el consorcio de HMA presente en el suelo El Arenal y esto favorecería su colonización. El

inóculo fue el suelo El Arenal, el cual tenía una densidad inicial de 44.7 esporas/10g de suelo (S1), 43.7 esporas/10g de suelo (S2) y 56.3 esporas/10g de suelo (S3).

Las macetas se mantuvieron en invernadero durante seis meses entre febrero y agosto de 2015. El nivel de riego fue mínimo para someter a las plantas a un estrés hídrico que propiciara su asociación con los HMA, pero sin dejar morir las plantas. Al finalizar, las plantas se dejaron secar para promover la esporulación (INVAM, 2014). Se extrajeron y contaron las esporas de cada maceta con la metodología de (Brundrett *et al.*, 1994) descrita en el punto 4.1.3.1.

El conteo inicial de esporas se calculó de acuerdo a la densidad de esporas del suelo muestreado (El Arenal) y la cantidad agregada como inóculo en la maceta de propagación con respecto a la cantidad de arena estéril agregada. Se utilizó una unidad de volumen de suelo agrícola por cada cuatro volúmenes de suelo total en las macetas de propagación, entonces se multiplicó la densidad inicial de esporas del suelo El Arenal por 1/4.



**Figura 6.** Macetas de propagación de HMA con sorgo y alfalfa al inicio (izquierda) y final (derecha) del experimento.

#### 4.2.1.1 Determinación de viabilidad de los HMA

La viabilidad se evaluó de acuerdo con el método propuesto por An y Hendrix (1988) con bromuro de tetrazolio. Se agregó una misma cantidad de agua y de bromuro de tetrazolio al 98% (obtenido de Sigma) a las esporas y se dejaron 72 horas en oscuridad. Estas esporas se observaron bajo estereomicroscopio para cuantificar las viables que se coloreaban de rojo.

La viabilidad se calculó como el porcentaje de esporas coloreadas con respecto al total de esporas analizadas en una muestra. Con esta información y la obtenida del conteo de esporas se escogió la maceta de propagación que presentó una mayor esporulación y viabilidad para utilizar el sustrato de esa maceta como inóculo en el experimento.

### **4.3 Etapa III. Ensayo de germinación de sorgo y maíz con vinazas**

Los HMA son simbioses obligados y como tal se requiere una planta hospedera para su estudio. Algunas opciones consideradas para utilizar como planta hospedera eran sorgo, alfalfa o maíz por ser altamente micorrizables y de rápido crecimiento, las cuales son características convenientes para su uso como plantas hospederas (Corkidi *et al.*, 2008).

Sin embargo, no todas las plantas presentan la misma resistencia a estrés generado por la aplicación de vinazas al suelo. En un estudio anterior se observó que las plantas de sorgo y alfalfa no fueron resistentes a la aplicación de vinazas (Sánchez-Lizárraga, 2015b) y una semana después del riego únicamente algunas plantas de sorgo sobrevivieron. Por lo tanto, se realizó un ensayo *in vitro* con semillas de sorgo y maíz para evaluar los efectos de la vinaza a diferentes concentraciones en la germinación de estas plantas y decidir que planta hospedera se utilizaría.

#### **4.3.1 Establecimiento del ensayo de germinación**

En primer lugar se lavaron y desinfectaron las semillas de acuerdo con la metodología propuesta por Piernas y Guiraud (1997). Las semillas de sorgo (híbrido sorgo-pasto sudán) y maíz (*Zea mays*) se lavaron con agua estéril y se desinfectaron con una mezcla de hipoclorito de sodio al 4% y Tween 20, y después con peróxido de hidrógeno al 1% para evitar la proliferación de microorganismos durante el experimento.

A continuación, se colocaron 10 semillas (5 en el caso de maíz) por caja Petri sobre papel filtro esterilizado. El experimento se replicó 5 veces (10 veces para maíz) lo que dio un total de n=50 semillas de cada especie para cada tratamiento. Los tratamientos fueron cuatro concentraciones de vinaza (25%, 50%, 75% y 100%) y un control (agua destilada estéril). Para esto se agregaron 8 mL de la solución correspondiente a cada caja Petri. Finalmente se sellaron las cajas Petri (Figura 7). Las cajas se mantuvieron en incubadora

por 10 días a 28 °C en oscuridad, de acuerdo con el procedimiento experimental propuesto por González *et al.* (2014) para otras especies de plantas, utilizando vinazas de caña de azúcar.



**Figura 7.** Germinación in vitro de maíz (izquierda) y sorgo (derecha) con vinaza al 50%.

### 4.3.2 Evaluación de la germinación de semillas

A los cuatro días del establecimiento del experimento se contaron las semillas germinadas por caja sin abrir. De esta manera se calculó el porcentaje de germinación por caja con la siguiente fórmula:

$$\%G = \frac{SG}{SNG} \times 100\%$$

Donde **%G** es el porcentaje de germinación por cada caja Petri, **SG** es la cantidad de semillas germinadas por caja Petri y **SNG** es la cantidad de semillas no germinadas por caja Petri. En el caso de maíz se tomaron dos cajas Petri por réplica para tener la misma cantidad de semillas por réplica de sorgo y de maíz. Se realizó un análisis de varianza para evaluar las diferencias entre tratamientos en el porcentaje de germinación de las dos especies y las diferencias entre especies.

Al finalizar los 10 días se midió la longitud de la radícula e hipocótilo de cada semilla. Se sacaron las semillas y con ayuda de una regla se midió desde el nacimiento de la semilla hasta la punta de la radícula o hipocótilo. En este caso solamente se tomaron en cuenta las semillas germinadas para el análisis de varianza.

## 4.4 Etapa IV. Experimento en invernadero

Durante la última etapa se realizó el experimento en invernadero en el que se evaluó la simbiosis micorrízica, el crecimiento de la planta y algunos parámetros del suelo antes y después de la aplicación de vinazas tequileras a diferentes concentraciones de vinaza y niveles de pH, el cual será descrito a continuación.

### 4.4.1 Establecimiento del experimento

En este experimento se evaluaron dos factores, inóculo y tratamiento. El factor inóculo se analizó para comparar la resistencia del inóculo propagado del suelo El Arenal, llamado inóculo *N* (nativo), contra un control positivo que es un inóculo comercial (inóculo *I*) compuesto por esporas de *Rhizophagus intraradices* (obtenido del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias o INIFAP). El inóculo nativo está compuesto por una mezcla de especies de HMA presuntivamente adaptadas a las condiciones de perturbación de las vinazas. El inóculo comercial utilizado está integrado por una especie dominante (Mathimaran *et al.*, 2005) que ha sido estudiada como modelo de HMA (Koide y Kabir, 2000), además, la especie *R. intraradices* ha probado ser benéfica para las plantas en condiciones de perturbación como sequía (Celebi *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014) o salinidad (Evelin *et al.*, 2012).

El segundo factor es el tratamiento. Los cinco tratamientos se muestran en la Tabla 3. Estos fueron dos niveles de pH de la vinaza: 3.5 y 4.5, y dos niveles de materia orgánica (MO%) en forma de dilución de vinaza: 30% y 60%, además de un control con agua destilada.

El diseño experimental consistió de un diseño multifactorial de dos factores, los cuales son inóculo y tratamiento. El primer factor tiene dos niveles (*N* e *I*) y el segundo factor cinco niveles (3.5 – 30%, 3.5 – 60%, 4.5 – 30%, 4.5 – 60% y A). Se utilizaron 6 réplicas de cada combinación de factores considerando dos réplicas del S1, dos del S2 y dos del S3 para representar el suelo de todo el predio El Arenal regado con vinazas tequileras.

**Tabla 3.** Tratamientos de riego.

Tratamiento	Riego	pH	MO %
3.5 – 30%	Vinaza	3.5	30
3.5 – 60%	Vinaza	3.5	60
4.5 – 30%	Vinaza	4.5	30
4.5 – 60%	Vinaza	4.5	60
A	Agua	-	-

#### 4.4.1.1 Pre-germinación de maíz

El experimento se realizó con plantas de maíz ya que fue la especie vegetal menos afectada con los diferentes niveles de vinaza utilizados en la prueba de germinación de la etapa III. Las semillas de maíz se lavaron con agua, después se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 4% y se enjuagaron tres veces con agua estéril.

Las semillas se colocaron dentro de un rollo de papel húmedo con agua estéril en una campana de flujo laminar. En total se realizó la pre-germinación de aproximadamente 400 semillas. Los rollos se colocaron en bolsas resellables con suficiente agua estéril y se mantuvieron en incubadora por cinco días a 28 °C para su germinación.

#### 4.4.1.2 Inoculación de HMA y siembra de maíz

El suelo para todos los tratamientos se esterilizó en autoclave por 6 horas a 121 °C para eliminar a las esporas de HMA y a otros microorganismos presentes. Se colocaron 4.5 kg de suelo (S1, S2 o S3) en cada maceta, las cuales consistieron de bolsas negras de polipropileno con orificios al fondo para drenar el agua.

En cada maceta se sembraron dos plántulas de maíz y se agregó el inóculo correspondiente a la raíz, 58 esporas viables por maceta. Los dos inóculos de HMA fueron el inóculo propagado de suelo con vinazas o nativo (*N*) y un inóculo comercial de INIFAP® compuesto de *Rhizophagus intraradices* (*I*), del primer inóculo (*N*) se agregaron 13.9 gramos y del segundo (*I*) se agregaron 6.3 gramos para inocular la cantidad de esporas antes señalada. Las plantas se regaron con agua de la llave por un mes para asegurar el



establecimiento de la simbiosis y dejar crecer la planta previo al riego con vinazas (Figura 8). A los 14 días se cortó una de las plantas para dejar solamente una en cada maceta, cuidando que fueran de tamaño similar.



**Figura 8.** Crecimiento de plantas de maíz previo al riego con vinazas.

#### 4.4.1.3 Riego con vinazas

Transcurrido un mes para permitir la asociación simbiótica del maíz con el inóculo de HMA y el crecimiento de la planta, se comenzó a aplicar el tratamiento correspondiente. Las macetas fueron sometidas a riegos de vinazas tequileras a necesidad de la planta (1 ó 2 veces por semana), pero manteniendo condiciones de estrés por sequía para promover la asociación con los HMA. En cada riego se agregaron 200 ó 300 mL de vinazas. Durante los tres meses de riego se agregó un acumulado de 4.3 litros de vinazas por maceta.

El acondicionamiento de la vinaza a las condiciones de cada tratamiento se realizó primero haciendo la dilución correspondiente con agua destilada (al 30% o 60%) y posteriormente ajustando el pH a 3.5 con la cantidad necesaria de HCl (0.1 N) o a un pH de 4.5 con NaOH (1 N). Así los cinco tratamientos fueron: 3.5-30%, 3.5-60%, 4.5-30%, 4.5-60% y agua (A).

Las macetas se mantuvieron en invernadero durante los tres meses de la aplicación del tratamiento, fueron distribuidas aleatoriamente. Además, cada mes se realizó la rotación de macetas para evitar que se presentara un sesgo en su crecimiento respecto a su localización en el invernadero por la cantidad de sol y calor que recibían. La temperatura del invernadero fue de 19.5 °C en promedio oscilando durante el día entre 11.2 °C (mínima promedio) y 31.3 °C (máxima promedio) y una humedad relativa promedio de 60.7% oscilando entre 29.2% y 82.4%. La experimentación se llevó a cabo desde diciembre 2015,

cuando se realizó el establecimiento del experimento, hasta abril 2016, cuando se retiraron las plantas.

#### **4.4.2 Evaluación del crecimiento de la planta**

Los dos parámetros de crecimiento de la planta que se evaluaron durante el experimento fueron la altura y la biomasa. Al inicio del experimento ( $t_0$ ), que es justo después del primer riego con vinazas, y cada mes ( $t_1$ ,  $t_2$  y  $t_3$ ) se realizó la medición de altura de la planta desde la base del tallo al ápice con un flexómetro. Al finalizar ( $t_3$ ) se determinó también la biomasa total, tomando la raíz y la parte aérea. Para ello se determinó el peso seco de la planta, obtenido después de secar el material vegetal en estufa tres días a 60 °C.

#### **4.4.3 Evaluación del suelo**

Se evaluaron algunos de los parámetros más importantes del suelo para el desarrollo de la planta y los HMA al inicio y al final del experimento. El primer muestreo se realizó en el tiempo 0 ( $t_0$ ), que es previo al primer riego con vinazas, y el segundo muestreo ( $t_3$ ) se realizó al hacer el levantamiento del experimento. Los análisis del suelo realizados fueron pH, conductividad eléctrica (CE), concentración de fosfatos y concentración de fenoles totales.

##### **4.4.3.1 Potencial de hidrógeno y conductividad eléctrica del suelo**

Se midió el pH del suelo en solución acuosa como lo determina la NOM-021-SEMARNAT-2000 ya que existen reportes de variaciones de pH en el suelo durante la aplicación de enmiendas orgánicas como la vinaza (Vadivel *et al.*, 2014). Esto podría tener un efecto negativo en las plantas o HMA que están adaptados a las condiciones actuales de pH. También se determinó la CE del suelo de acuerdo con lo descrito por la NMX-FF-109-SCFI-2007 con un extracto 1:2 de suelo con agua. Este parámetro fue importante por el riesgo de un aumento en la concentración de sales agregadas por medio de la vinaza

(Madejón *et al.*, 2001). Ambos procedimientos consisten en agregar una cierta cantidad de agua al suelo, agitar y medir el potencial de hidrógeno y la conductividad de esta solución con un potenciómetro o conductímetro, respectivamente.

El valor de CE del suelo caracterizado inicialmente, así como los valores de referencia de la NOM-021, fueron medidos en un extracto de saturación. Debido a que el resto de las mediciones se realizaron con un extracto 1:2 de suelo con agua, se convirtieron estos valores utilizando la relación de  $y = 0.459x - 0.03$  (coeficiente de correlación de 0.948) encontrada por Sonneveld y Van den Ende (1971), quienes calcularon la correlación entre la conductividad del suelo de un extracto de saturación (x) y un extracto 1:2 (y).

Los parámetros se midieron usando el equipo y los electrodos mencionados en la Tabla 1. Metodologías de caracterización de suelo.

#### 4.4.3.2 Concentración de fósforo disponible

La evaluación de la concentración de fósforo disponible en el suelo es importante por ser uno de los nutrientes más relacionados con la actividad de los HMA (Parniske, 2008). Se ha observado que la mayor actividad de estos hongos se encuentra en suelos deficientes de fósforo ya que uno de sus beneficios principales a la planta hospedera es el suministro de dicho elemento mineral (Bucher, 2007). Una alta concentración de fosfatos en el suelo disminuye la necesidad de la planta a asociarse con los HMA (Na Bhadalung *et al.*, 2005) y, por lo tanto, no recibe el resto de las ventajas de esta simbiosis .

La extracción de fósforo disponible se realizó de acuerdo con la técnica de Olsen *et al.* (1954), la cual consiste en la preparación y adición al suelo de una solución extractora de bicarbonato de sodio 0.5 M ajustado a un pH de 8.5. Esta solución permite la precipitación de carbonato de calcio, el aumento de la solubilidad de fosfatos de aluminio y hierro y, en consecuencia, el incremento de fósforo disuelto (Mattigod y Zachara, 1996).

Por último, se evaluó la concentración de fosfatos con el método colorimétrico de Hanna. La concentración se midió en un fotómetro multiparamétrico (Tabla 1). El método es una adaptación del método colorimétrico 4500-P E. descrito en el manual *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (American Public Health Association *et al.*,

1999), que consiste en una reacción entre el fosfato en la muestra y el molibdato de amonio con tartrato de antimonio y potasio en medio ácido, que da lugar a un complejo reducido por ácido ascórbico coloreado de azul intenso. De esta manera, al medir la absorbancia de la muestra se pudo determinar la concentración de fosfatos.

#### 4.4.3.3 Fenoles totales

Como ya se mencionó, este grupo de compuestos están presentes en las vinazas tequileras y su actividad está relacionada con una inhibición en el crecimiento de plantas y microorganismos. La extracción de fenoles totales del suelo se realizó con agua de acuerdo con la propuesta de Muscolo *et al.* (2013). Se escogió debido a que al ser el agua el único solvente presente en la naturaleza (Li *et al.*, 2010), representaría lo más cercano a lo que sucede en condiciones reales. La metodología consistió en agregar 10 mL de agua destilada a 2 gramos de suelo y mezclar en un agitador orbital por 20 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 10,000 rpm y se tomó el sobrenadante para evaluar la concentración de fenoles totales.

Se siguió la metodología de Folin-Ciocalteu para la determinación colorimétrica de fenoles totales descrita por Singleton y Rossi (1965). Al extracto obtenido se agregó agua, el reactivo Folin-Ciocalteu (2 M con respecto al ácido, obtenido de Sigma-Aldrich) y carbonato de sodio al 20%. Las proporciones utilizadas son siete partes en volumen de agua, 0.5 de Folin-Ciocalteu y 1.5 de carbonato de sodio por cada parte de la muestra. Se dejó desarrollar el color por dos horas y se midió la absorbancia de la solución coloreada de azul a 765 nm en un espectrofotómetro de placa. Se preparó una curva estándar siguiendo los mismos pasos, pero agregando diferentes diluciones de ácido gálico (obtenido de Sigma-Aldrich) como compuesto de referencia (0, 5, 10, 15, 20 y 30 ppm), en lugar de la muestra.

A pesar de la gran cantidad y diversidad de compuestos fenólicos que podrían presentarse, se ha encontrado que la solución de la reacción obtenida con el reactivo Folin-Ciocalteu tiene una longitud de onda máxima similar para diferentes compuestos fenólicos y algunos fenoles sustituidos tienen el mismo coeficiente de absorción molar que el fenol, lo que permite cuantificarlos por medio de este método colorimétrico (Box, 1983). Aunque hay

variantes de esta técnica se escogió el uso de carbonato de sodio como álcali y el reactivo Folin-Ciocalteu en lugar de Folin-Denis por prevenir la formación de precipitados. Además, el color en el carbonato de sodio se ha reportado como estable (Singleton y Rossi, 1965).

#### 4.4.3.4 Humedad

Las muestras de suelo se analizaron en base húmeda y para hacer la corrección calculando todos los parámetros en base seca se determinó la humedad de cada muestra. La medición se realizó con una muestra de un gramo en una termobalanza a 105 °C (NOM-021-SEMARNAT-2000). La humedad en la termobalanza se calculó en base húmeda:

$$\%H = \frac{P_{SH} - P_{SS}}{P_{SH}} \times 100$$

Donde  $\%H$  es el porcentaje de humedad,  $P_{SH}$  es el peso del suelo húmedo y  $P_{SS}$  es el peso del suelo seco.

A partir de este dato de humedad se aplicó la siguiente corrección para convertir las concentraciones de diferentes compuestos en el suelo de base húmeda a base seca.

$$C_{bs} = C_{bh} \times \frac{100}{100 - \%H}$$

Donde  $\%H$  es el porcentaje de humedad,  $C_{bs}$  es la concentración en base seca y  $C_{bh}$  es la concentración en base húmeda.

#### 4.4.4 Evaluación de la simbiosis micorrízica

En el muestreo inicial ( $t_0$ ) y final ( $t_3$ ) se realizó la cuantificación de esporas de HMA por el método descrito en la sección 4.1.3.1. Además, se identificaron morfológicamente las especies de una muestra de  $n=3$  en el tiempo final ( $t_3$ ) de acuerdo con lo señalado en el punto 4.1.3.2. A partir de esta información se evaluaron los cambios en la riqueza y diversidad de especies como se indicó en la sección 4.1.3.3.

Adicionalmente, se determinó el porcentaje de colonización de HMA en una muestra de n=3 al finalizar el experimento (t<sub>3</sub>) para evaluar el efecto de las vinazas en la simbiosis micorrízica. Se tomó una muestra de raíz al finalizar y se almacenó en solución de FAA compuesta por formaldehído, ácido acético, etanol y agua en proporción 2:1:10:7 (en volumen) para posteriormente determinar el porcentaje de colonización.

La colonización por HMA es un parámetro importante ya que da información acerca de la capacidad del hongo de llevar a cabo la simbiosis con esa planta bajo condiciones ambientales particulares. Aunque existen variaciones del método, en general se realiza un clareo de las raíces en primer lugar, seguido por la tinción de las estructuras fúngicas para poder observarlas dentro de la raíz. El azul de tripano es un compuesto comúnmente utilizado ya que tiene afinidad por los componentes de pared celular de las estructuras producidas por los HMA y no por estructuras de la planta. En este trabajo se utilizó la metodología de clareo y tinción (Phillips y Hayman, 1970) con algunas adaptaciones.

Las raíces se lavaron y calentaron en microondas en una solución de KOH al 10%. El hidróxido de potasio caliente permite el clareo de la corteza externa de la raíz por medio de una digestión de los pigmentos de la pared celular (Álvarez-Sánchez y Monroy, 2008). Posteriormente se sumergieron en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 5% para blanquearlas y se enjuagaron con HCl al 10%, lo que permitió la fijación del colorante. El último paso fue dejar reposar las raíces en una solución de azul de tripano al 0.01% en lactoglicerol (ácido láctico, glicerina y agua). Las raíces teñidas se escurrieron y montaron en secciones de un centímetro en portaobjetos y se fijaron con PVLG (alcohol polivinílico-lactoglicerol) para su observación en el microscopio.

Se observaron aproximadamente 60 campos por muestra en un microscopio óptico (Olympus BH-2) para determinar la colonización total por el método de McGonigle *et al.* (1990) modificado. La metodología consistió en cuantificar las estructuras presentes en cada intersección con el campo visual con un objetivo de 20X y calcular el porcentaje de colonización como se muestra:

$$\% \text{ Colonización} = \frac{\text{Campos colonizados}}{\text{Campos observados}} \times 100\%$$

Las estructuras presentes que se consideraron para el porcentaje de colonización en la raíz son las esporas de HMA, hifas (aseptadas), arbusculos y vesículas que se encontraran dentro de la raíz. En el caso de no existir ninguna de estas estructuras se contó como un campo no colonizado.

## **4.5 Análisis estadístico**

Todos los parámetros evaluados se analizaron estadísticamente con un nivel de significancia del 95%. Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial para encontrar los factores que tuvieron un impacto en los parámetros de crecimiento de la planta, de los HMA y de las características del suelo. Adicionalmente se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson para todos los parámetros y se llevó a cabo un análisis de componentes principales (ACP) con todas las variables medidas y los factores del experimento. Los análisis anteriores se realizaron por medio del programa *Statgraphics Centurion* Versión XVI.

Además, se utilizó el procedimiento del modelo lineal general (GLM) con un nivel de significancia del 95% para comparar las medias entre tratamientos, inóculos y el tiempo con el programa *Statistical Analysis System (SAS)* University Edition.





# 5 Resultados y discusión

## 5.1 Muestreo y caracterización

### 5.1.1 Vinazas tequileras

Se evaluaron las principales características fisicoquímicas de las vinazas y se encontró una similitud respecto a trabajos anteriores en los que se ha realizado una caracterización de vinazas tequileras. Los resultados de las vinazas muestreadas en este trabajo se pueden ver en la Tabla 4. Se compararon los resultados con la norma mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996 (Tabla 2) y de Estados Unidos EPA/625/R-04/108 (USEPA, 2004) (Table 2-7. Recommended Limits for Constituents in Reclaimed Water for Irrigation) que definen los límites máximos permisibles de diferentes parámetros en agua para riego a suelos agrícolas.

Se observó que en algunos parámetros como la demanda biológica de oxígeno (DBO) hay un intervalo amplio de valores explicado principalmente por ser vinazas de un proceso tradicional que puede variar en su composición final. No hay conocimiento de que se dé un tratamiento a las vinazas muestreadas o se mezclen con otras aguas residuales antes de su disposición final.

En primer lugar, destaca el pH ácido de las vinazas, de 3.9 a 4.24. Justo antes de regarse al suelo tienen una acidez menor a 4, lo cual sugiere que no existe un tratamiento adecuado antes de disponerse. La norma EPA/625/R-04/108 recomienda un pH de 6 a 8 en el agua de riego para evitar un efecto negativo en los cultivos, principalmente en relación a la toxicidad por metales como aluminio. Éste se precipita en un pH de 5.5 a 8.0, mientras que a un pH menor es tóxico (Rowe y Abdel-Magid, 1995).

**Tabla 4.** Caracterización fisicoquímica de vinazas tequileras.

Parámetro	Vinazas tequileras	NOM-001-SEMARNAT-1996 <sup>†</sup>	EPA/625/R-04/108 <sup>†</sup>
pH	3.49-4.24 ± 0.01-0.08*	N.E.	6
Conductividad eléctrica (CE) (mS cm <sup>-1</sup> )	2.46-3.5 ± 0-0.1*	N.E.	N.E.
Fósforo disponible (medido como fosfatos (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )) (mg L <sup>-1</sup> )	67.6-326.7 ± 0.8-30.6*	N.E.	N.E.
Fósforo total (PT) (mg L <sup>-1</sup> )	10.23-652.66 ± 1.9-25.48*	30 <sup>§</sup>	N.E.
Materia orgánica (MO) (%)	2.2-3.9 ± 0.0-0.2*	N.E.	N.E.
Nitritos (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) (mg L <sup>-1</sup> )	3.7 ± 0.6	N.E.	N.E.
Nitratos (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) (mg L <sup>-1</sup> )	N.D.	N.E.	N.E.
Amonio (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) (mg L <sup>-1</sup> )	456.3 ± 8.4	N.E.	N.E.
Nitrógeno total (NT) (mg L <sup>-1</sup> )	140.55-586.67 ± 4.55-11.55*	60 <sup>§</sup>	N.E.
Demanda química de oxígeno (DQO) (mg L <sup>-1</sup> )	40,433-57,246 ± 846-2148*	N.E.	N.E.
Demanda biológica de oxígeno (DBO) (mg L <sup>-1</sup> )	13,500-40,005 ± 458-3,481*	200 <sup>§</sup>	N.E.
Sólidos totales (mg L <sup>-1</sup> )	28,000-133,833 ± 577-1,485*	N.E.	N.E.
Sólidos suspendidos totales (mg L <sup>-1</sup> )	6,000-14,027 ± 500-852*	200 <sup>§</sup>	N.E.
Sólidos suspendidos volátiles (mg L <sup>-1</sup> )	11,000-12,333 ± 890-2000*	N.E.	N.E.
Sólidos volátiles totales (mg L <sup>-1</sup> )	38,800-119,683 ± 1,353-1,800*	N.E.	N.E.
Sólidos disueltos totales (mg L <sup>-1</sup> )	12,300-119,807 ± 2,211-2,500*	N.E.	500-2000
Sólidos sedimentables (mL L <sup>-1</sup> )	1.8-5.3 ± 0.3-0.7*	2 <sup>§</sup>	N.E.
Sodio (Na <sup>+</sup> ) (mg L <sup>-1</sup> )	33.5 ± 22.7	N.E.	N.E.
Potasio (K <sup>+</sup> ) (mg L <sup>-1</sup> )	351.9 ± 20.0	N.E.	N.E.
Calcio (Ca <sup>2+</sup> ) (mg L <sup>-1</sup> )	865.9 ± 645.1	N.E.	N.E.
Magnesio (Mg <sup>2+</sup> ) (mg L <sup>-1</sup> )	202.1 ± 42.1	N.E.	N.E.
Fenoles (mg L <sup>-1</sup> )	320.7-1,052.7 ± 0.0-41.6*	N.E.	N.E.
Arsénico (As) (mg L <sup>-1</sup> )	<1.0 ± 0	0.4	0.1
Cadmio (Cd) (mg L <sup>-1</sup> )	<0.3 ± 0	0.1	0.01
Cobre (Cu) (mg L <sup>-1</sup> )	4 ± 1.3	6	0.2
Cromo (Cr) (mg L <sup>-1</sup> )	<1.0 ± 0	1	0.1
Mercurio (Hg) (mg L <sup>-1</sup> )	<0.1 ± 0	0.01	N.E.
Plomo (Pb) (mg L <sup>-1</sup> )	<1.0 ± 0	10	5
Níquel (Ni) (mg L <sup>-1</sup> )	<1.0 ± 0	4	0.2
Zinc (Zn) (mg L <sup>-1</sup> )	1.6 ± 0	20	2
Hierro (Fe) (mg L <sup>-1</sup> )	32 ± 6.3	N.E.	5

N.E. no especificado, N.D. no detectable; \*Intervalo de diferentes lotes de producción de vinaza; <sup>†</sup>Límites permisibles para riego a suelos agrícolas; <sup>§</sup>Límites permisibles para descarga a ríos para uso de riego agrícola; n=3.

Las vinazas muestreadas también tienen un alto contenido de materia orgánica expresada como DQO (40,433 – 57,246 mg/L) y DBO (13,500 – 40,005 mg/L), como se ha reportado anteriormente. López-López *et al.* (2010) reportaron un intervalo de 60 a 100 g/L de DQO y de 35 a 60 g/L de DBO, mientras que Buitrón y Carvajal (2010) reportaron una concentración de 29.9 a 30.5 g/L y de 19.8 a 20.9 g/L, respectivamente. Estos parámetros no están regulados por la norma mexicana (NOM-001-SEMARNAT-1996), sólo para descarga en ríos para uso agrícola (200 mg/L). Además, en la Tabla 4.9 de la norma estadounidense (EPA/625/R-04/108) se reportan niveles máximos de DBO5 de diferentes regulaciones estatales entre 10 y 45 mg/L en cultivos no alimentarios. Por lo tanto, las vinazas tequileras no debieran ser usadas como agua de riego, simplemente por el contenido excesivo de materia orgánica.

Con respecto al contenido de fósforo, se encontró una alta concentración de fósforo disponible (67.6 – 326.7 mg/L) en las vinazas. López-López *et al.* (2010) reportaron valores mayores (100-700 mg/L) y un contenido de nitrógeno total menor (20-50 mg/L) a lo reportado en este trabajo (140.55 – 586.67 mg/L). Por otra parte, se observó que la vinaza tenía una alta concentración de amonio ( $456.3 \pm 8.4$  mg/L) en comparación con los nitritos ( $3.7 \pm 0.6$  mg/L) y nitratos (no detectado), lo cual indicó un proceso de mineralización de la materia orgánica que apenas empezaba su proceso de nitrificación o desnitrificación. La concentración de fósforo total (10.23 – 69.1 mg/L), de nitrógeno total y de sólidos sedimentables (1.8 – 5.3 mL/L) fue mayor a lo permitido para descarga a ríos para uso agrícola (NOM-001).

La vinaza tuvo una alta concentración de cationes como calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (865.9 mg/L), potasio ( $\text{K}^+$ ) (351.9 mg/L), magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) (202.1 mg/L) y sodio ( $\text{Na}^+$ ) (33.5 mg/L). Estas altas concentraciones de sales han sido reportadas por otros autores como Retes-Pruneda *et al.* (2014), quienes encontraron 226 mg/L de Ca, 104 mg/L de Mg y López-López *et al.* (2010) quienes reportaron 200-1000 mg/L de Ca, 100-300 mg/L de Mg y 150-650 mg/L de K.

Además, la conductividad eléctrica encontrada (2.46-3.5 mS/cm) está clasificada como un problema incremental o problema severo de acuerdo a las guías para interpretación de calidad del agua para irrigación (Ayers y Westcot, 1976). La salinidad se considera que es

uno de los mayores riesgos al utilizar la vinaza en composta o para riego (Fuess y Garcia, 2014).

El contenido de metales y metales pesados en las vinazas estuvo dentro de los lineamientos que marcan las normas, con excepción del cobre (4 mg/L) y hierro (32 mg/L), los cuales exceden el límite de la EPA. De acuerdo con Prado Ramírez (2015), en el tequila se puede encontrar una concentración alta de cobre por un proceso de corrosión del equipo de destilación que puede llegar hasta 10 mg/L cuando el sistema ha estado fuera de operación unos días. Por lo tanto, también la vinaza contiene parte de este cobre (Cu) y se ha reportado entre 0.36 y 4 mg/L (España-Gamboa *et al.*, 2011). En cuanto al hierro (Fe), también se encuentra en una concentración similar al registrado en otros trabajos como 14 mg/L (Retes-Pruneda *et al.*, 2014) o 35.2 – 45 mg/L (España-Gamboa *et al.*, 2011) para otras fuentes de vinaza. No se recomienda regar una concentración mayor de 0.2 mg/L de Cu por la posible toxicidad a las plantas ni mayor a 5 mg/L de Fe por su contribución en la acidificación del suelo, además de la pérdida de disponibilidad de fósforo y molibdeno (USEPA, 2004).

En la Tabla 4 se puede observar que los límites para riego directo a suelos agrícolas no están definidos en la mayoría de los parámetros por parte de la norma mexicana ni la norma de la EPA. Como se mencionó, Brasil es el único país donde se regula la aplicación de vinazas a suelos agrícolas (CETESB, 2006), pero solamente en relación al K<sub>2</sub>O en el suelo. Destaca, por último, una concentración de compuestos fenólicos de 320.7 a 1052.7 mg/L medidos como fenoles totales equivalentes a ácido gálico. Esta concentración fue mayor a lo reportado en otras vinazas de tequila como 44 a 81 mg/L (Buitrón y Carvajal, 2010) y 153 mg/L (Retes-Pruneda *et al.*, 2014). A pesar de que el proceso de producción es el mismo, es un proceso artesanal en el que no se esperan exactamente las mismas condiciones, por lo cual se pudieran generar algunas inconsistencias. Las diferencias en el contenido fenólico podrían también estar dadas por la etapa de maduración del agave. Almaraz-Abarca *et al.* (2009) reportaron diferencias en los compuestos fenólicos en el tejido foliar entre plantas jóvenes y adultas de *Agave durangensis*.

Por otra parte, la identidad de los compuestos fenólicos presentes en las vinazas utilizadas en este experimento se analizó por cromatografía en otro trabajo (Rodríguez-Félix *et al.*,

2016a) y se encontraron ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido caféico, vainillina, 2,4-di-*tert*butilfenol, siringaldehído y quercetina. Algunos compuestos como el ácido ferúlico, ácido hidroxibenzoico, ácido caféico, vainillina y quercetina pueden ser inhibidores o tóxicos para el desarrollo de las plantas y los HMA (ver secciones 5.4.2 y 5.4.3).

Por último, durante el proceso de destilación se generan melanoidinas como productos de Maillard y grandes cantidades de compuestos fenólicos, entre otros. Su composición y concentración depende de las condiciones del proceso, pero Prado Ramírez (2015) encontró un aumento de hasta el 250% en la cantidad de compuestos fenólicos presentes en el tequila con respecto al mosto fermentado. Esto indica que la mayor parte de estos compuestos se forman en esta etapa y muchos de ellos podrían quedarse en la vinaza.

### **5.1.2 Suelo agrícola**

El suelo muestreado (Tabla 5) fue un suelo Feozem de acuerdo con INEGI (2010) y con base en el contenido de arcilla, limo y arena se caracterizó por ser de textura franco arenoso. Esta textura indica una mayor proporción de arena (72.27%), seguida por arcilla (17.34%). La presencia de arcilla indica un suelo fértil con alto contenido de nutrientes y buena capacidad de retención de agua. Sus características fisicoquímicas se compararon con la norma mexicana, que es la que establece las especificaciones de la clasificación de suelos y su fertilidad (NOM-021-SEMARNAT-2002) y con el manual de evaluación de suelos (Soil Survey Field and Laboratory Methods Manual Version 2) del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (United States Department of Agriculture, 2014).

De acuerdo con estas normas el suelo se caracterizó por ser moderadamente ácido (pH de  $5.88 \pm 0.24$ ) y tener una conductividad eléctrica despreciable ( $0.234 \pm 0.040$  mS/cm). Se encontró un contenido alto de fosfatos ( $28.34 \pm 9.18$  mg/kg), un contenido medio de nitrógeno total ( $1033.3 \pm 656.3$  mg/kg) y un contenido muy alto de materia orgánica ( $70.00 \pm 0.00$  g/kg).

**Tabla 5.** Caracterización fisicoquímica de suelo regado por vinazas.

Parámetro	Suelo	NOM-021-SEMARNAT-2000	USDA (2014)
Clasificación textural	Franco arenoso	Ca	N.E.
Tipo de suelo	Feozem	N.E.	N.E.
pH	5.88 ± 0.24	Moderadamente ácido	Moderadamente ácido
Conductividad eléctrica (CE) (dS m <sup>-1</sup> )	0.234 ± 0.040	Efectos despreciables	No salino
Capacidad de retención de agua (CRA) (%)	76.31 ± 2.36	N.E.	N.E.
Humedad (%)	5.62 ± 0.73	N.E.	N.E.
Capacidad de intercambio catiónico (CIC) (Cmol (+) kg <sup>-1</sup> )	8.3 ± 0.6	Baja	N.E.
Cenizas (%)	93.00 ± 0.00	N.E.	N.E.
Arena (%)	72.27 ± 2.18	N.E.	N.E.
Arcilla (%)	17.34 ± 1.51	N.E.	N.E.
Limo (%)	10.39 ± 2.18	N.E.	N.E.
Fósforo disponible (PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> ) (mg kg <sup>-1</sup> )	28.34 ± 9.18	Alto	N.E.
Fósforo total (PT) (mg kg <sup>-1</sup> )	84.4 ± 33.4	N.E.	N.E.
Carbono orgánico total (COT) (g C kg <sup>-1</sup> )	40.60 ± 0.00	N.E.	N.E.
Materia orgánica (MO) (g kg <sup>-1</sup> )	70.00 ± 0.00	Muy alto	N.E.
Nitrógeno total (NT) (mg kg <sup>-1</sup> )	1033.3 ± 656.3	Medio	N.E.
Plomo (Pb) (mg kg <sup>-1</sup> )	13.62 ± 1.09	Normal	N.E.
Cadmio (Cd) (mg kg <sup>-1</sup> )	<0.25	Normal	N.E.
Hierro (Fe) (g kg <sup>-1</sup> )	9.734 ± 0.297	Adecuado	N.E.
Manganeso (Mn) (mg kg <sup>-1</sup> )	283.0 ± 37.0	Adecuado	N.E.
Zinc (Zn) (mg kg <sup>-1</sup> )	35.3 ± 2.1	Adecuado	N.E.
Cobre (Cu) (mg kg <sup>-1</sup> )	12.04 ± 1.65	Adecuado	N.E.

N.E. significa no especificado; n=9

Un suelo Feozem tiene una concentración de materia orgánica típicamente de 5% (Food and Agriculture Organization, 2001) ya que es naturalmente rico en materia orgánica en las capas superiores (40 cm), como las que se muestrearon, con típicamente un 5% (Food and Agriculture Organization, 2001). En el presente trabajo fue probablemente aún mayor debido a la aplicación de vinazas y el uso agrícola del suelo. Además, el suelo Feozem se caracteriza por tener un pH entre 5 y 7 que coincide con el encontrado en el suelo muestreado.

Destaca una capacidad de intercambio catiónico de 8.3 Cmol/kg del suelo del Arenal, que se caracterizó como baja y una capacidad de retención de agua del 76%. El contenido de metales en el suelo se consideró adecuado de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000 y la especificación de concentraciones de metales pesados para suelos de uso agrícola en la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 en extensiones menores a 1000 m<sup>2</sup>.

### 5.1.3 Evaluación de los HMA en el suelo

El conteo de esporas de HMA del suelo muestreado (Tabla 6) se realizó para las tres secciones descritas anteriormente y se encontró que no existen diferencias significativas entre ellas, lo que indica una homogeneidad en el muestreo.

**Tabla 6.** Densidad de esporas de suelo agrícola El Arenal.

<b>Suelo</b>	<b>Densidad de esporas (10 g de suelo seco)</b>
SV1	44.7 ± 6.1a
SV2	43.7 ± 17.6a
SV3	56.3 ± 10a

Letras diferentes indican diferencia significativa entre suelos ( $p < 0.05$ ). n=3.

Esta densidad de esporas es menor a lo reportado por Pereira Aleixo *et al.* (2014) para suelo de caña, quienes encontraron una densidad de esporas de 96 – 131 esporas /10 g de suelo con una aplicación de vinazas de 100 m<sup>3</sup>/ha. Sin embargo, la aplicación de vinazas fue por

sólo una vez en el trabajo de Pereira Aleixo *et al.* (2014), mientras que en el predio estudiado en este trabajo la aplicación de vinaza era continua.

Sivakumar (2013) estudió suelos cultivados con caña de azúcar sin perturbación por riego de vinazas y encontró una densidad de esporas entre 11.9 a 58.3 esporas/10 g de suelo. El valor mayor es similar a lo encontrado en el presente trabajo. Además reportó un efecto de la estacionalidad en la densidad de esporas; en invierno encontró una baja densidad (22.2 esporas/10 g de suelo) y en verano una mayor densidad (37.9 esporas/10 g de suelo). El muestreo de este trabajo se realizó en febrero y se podría esperar entonces una menor abundancia de HMA que en otra temporada. El análisis morfológico de las esporas se muestra en la sección 5.2.3.

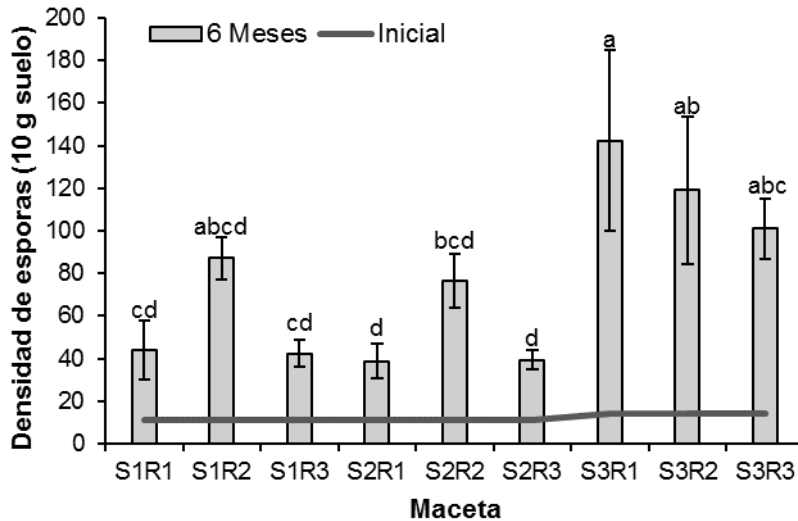
## **5.2 Propagación de esporas**

### **5.2.1 Cuantificación de los HMA propagados**

Los conteos al iniciar y finalizar la propagación de esporas se presentan en la Figura 9. Se observó que no hubo una propagación de esporas en la misma cantidad, pero sí hubo esporulación en todos los casos. En las macetas del suelo 3 (S3R1, R2 y R3) se encontró una mayor propagación después de los seis meses con una densidad de esporas promedio de 120 esporas/10 g. El suelo 3 tenía una densidad de esporas ligeramente mayor desde el muestreo del sitio, aunque sin diferencias significativas. Además, la abundancia de relativa de especies presentó diferencias entre suelos, y, por lo tanto, es posible que el consorcio del suelo 3 presentara una mayor afinidad con sorgo y alfalfa que los del suelo 1 y 2.

Gaur y Adholeya (2002) propagaron un inóculo nativo con sorgo (*Sorghum vulgare bicolor* var. Sudanese) y encontraron un año después una densidad de aproximadamente 250 esporas/10 g de suelo. En el trabajo de Gaur y Adholeya (2002) se agregó una parte de composta por dos de suelo en lugar de una parte de suelo por 3 de arena, por lo que el contenido de nutrientes y el tiempo fue mayor.





**Figura 9.** Densidad de esporas en el conteo inicial y a los seis meses. Las barras indican la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa entre macetas (nivel de significancia del 95%), n=3. El valor inicial se calculó de acuerdo a la densidad de esporas del suelo muestreado y la proporción de este suelo utilizado en las macetas de propagación.

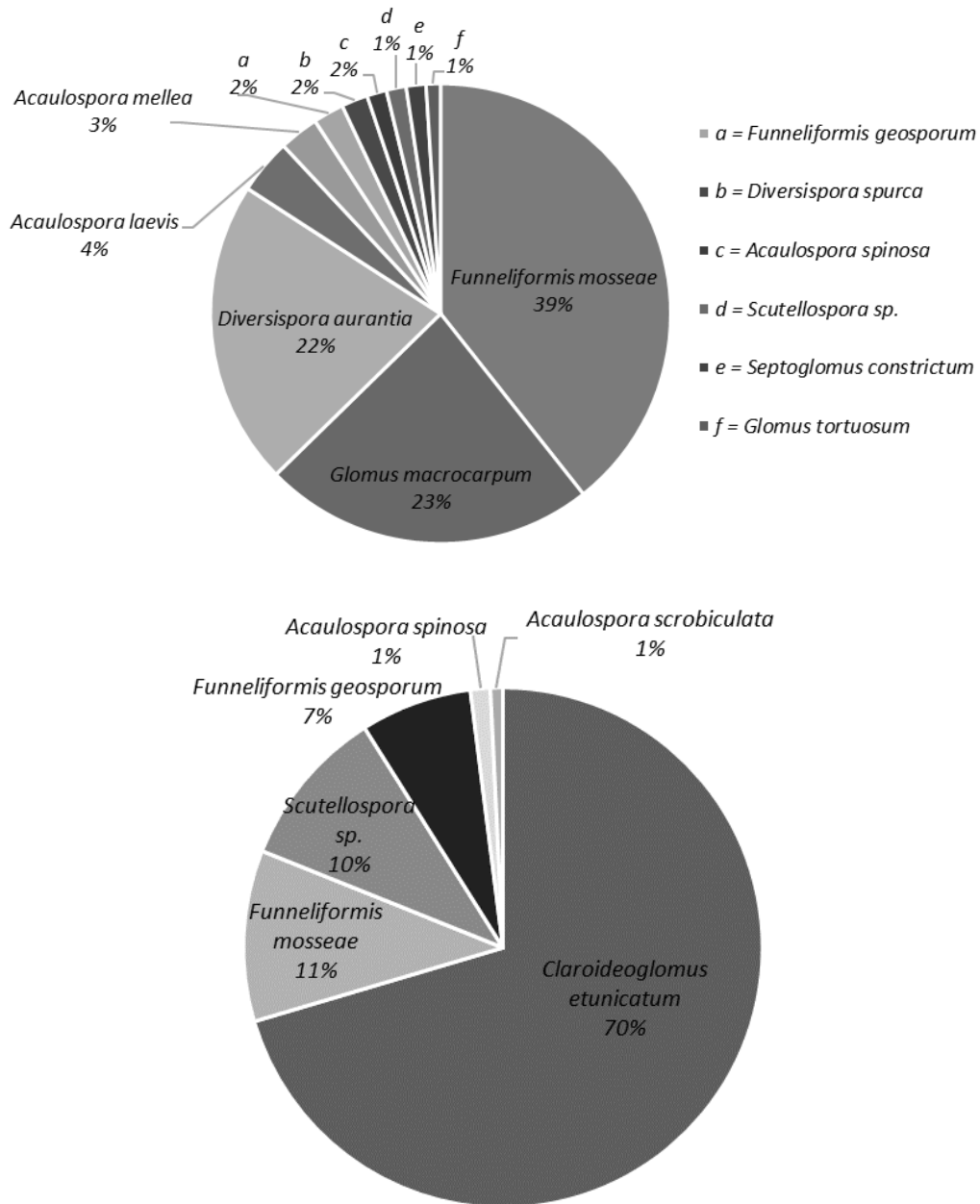
Los resultados de viabilidad (macetas con mayor propagación) mostraron que, la viabilidad de S3R1 fue muy baja ( $4\pm 7\%$ ); la mayor viabilidad se encontró en las macetas S3R2 ( $33\pm 21\%$ ) y S3R3 ( $43\pm 22\%$ ). Con base en estos resultados se seleccionó el inóculo S3R3 (en adelante inóculo nativo N) para utilizarlo en el experimento.

La evaluación de la densidad de esporas y viabilidad del inóculo comercial (I) mostró una densidad de esporas de  $137\pm 8$  esporas por 10 g y una viabilidad de  $68\pm 17\%$ . Se decidió agregar 60 esporas viables por maceta, por lo que se agregaron 13.9 g del inóculo N y 6.3 g del inóculo I a cada maceta correspondiente.

### 5.2.2 Abundancia relativa y diversidad de especies de los HMA propagados

Los resultados de la identificación morfológica posterior a la propagación indicaron que hubo una reducción en la diversidad y riqueza de especies. En el suelo El Arenal se encontraron 11 especies de HMA y en el suelo propagado solamente se identificaron 6 (Figura 10). Las especies que predominaron en el suelo El Arenal fueron *Funneliformis*

*mosseae* (39%), *Glomus macrocarpum* (23%) y *Diversispora aurantia* (22%), pero después de la propagación *Claroideoglossum etunicatum* fue la predominante (70.4%), seguida de *Funneliformis mosseae* (11%), *Scutellospora* sp. (10%) y *Funneliformis geosporum* (7%), en menor proporción. *Claroideoglossum etunicatum* fue encontrado anteriormente en una densidad de 3 esporas por 100 g de suelo en el mismo sitio de estudio (Sánchez-Lizárraga, 2015a).



**Figura 10.** Abundancia relativa de especies en el consorcio El Arenal (arriba) y el propagado (abajo). n=3.

La densidad de esporas en el suelo El Arenal y el suelo propagado (inóculo nativo) se muestra en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Densidad de esporas por especie del suelo El Arenal e inóculo nativo.

Especie de HMA	Esporas /10g de suelo				
	Suelo El Arenal			Promedio	
	S1	S2	S3	Suelo El Arenal	Inóculo nativo
<i>Acaulospora laevis</i>	0.0	3.6	0.0	1.3	0.0
<i>Acaulospora mellea</i>	0.0	0.0	6.5	1.9	0.0
<i>Acaulospora spinosa</i>	0.0	1.8	0.0	0.7	1.2
<i>Diversispora spurca</i>	1.7	0.0	1.6	1.0	7.0
<i>Diversispora aurantia</i>	8.5	7.3	16.2	10.4	0.0
<i>Funneliformis geosporum</i>	1.9	0.0	0.0	0.7	10.1
<i>Funneliformis mosseae</i>	9.3	29.1	17.2	19.0	10.7
<i>Glomus macrocarpum</i>	20.9	0.0	13.1	11.3	0.0
<i>Glomus tortuosum</i>	0.0	0.0	1.7	0.5	0.0
<i>Septoglomus constrictum</i>	2.5	0.0	0.0	0.9	0.0
<i>Scutellospora sp. (inmadura)</i>	0.0	1.8	0.0	0.7	0.0
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8
<i>Claroideoglomus etunicatum</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	71.1

La riqueza y diversidad de especies se muestran en la Tabla 8. La diversidad de especies en el inóculo nativo es menor, pero no así la riqueza.

**Tabla 8.** Riqueza y diversidad de especies del inóculo nativo antes y después de la propagación.

	Suelo El Arenal	Inóculo nativo
Riqueza	3.1 ± 1.1	4.0 ± 1.0
Diversidad	1.047 ± 0.206	0.810 ± 0.275

Otro factor a tomar en cuenta en las especies propagadas es la estacionalidad. Algunos autores reportan que hay HMA que esporulan en primavera, otros en verano u otoño y el resto del tiempo están en un etapa fisiológicamente activa (Bever *et al.*, 2001). La propagación del inóculo nativo se llevó a cabo principalmente en primavera y principios del verano, así que algunas de las especies con otro periodo de esporulación probablemente no se propagaron. Un ejemplo es *Gigaspora gigantea*, que presenta un pico de esporulación a

finales del verano (Bever *et al.*, 2001). Anteriormente se había encontrado *G. margarita* en este suelo del sitio de estudio, pero en esta ocasión no se identificó ninguna especie de este género. Además, la fase reproductiva de este género puede tardar hasta un año (De Souza *et al.*, 2005) y la propagación únicamente se realizó por seis meses.

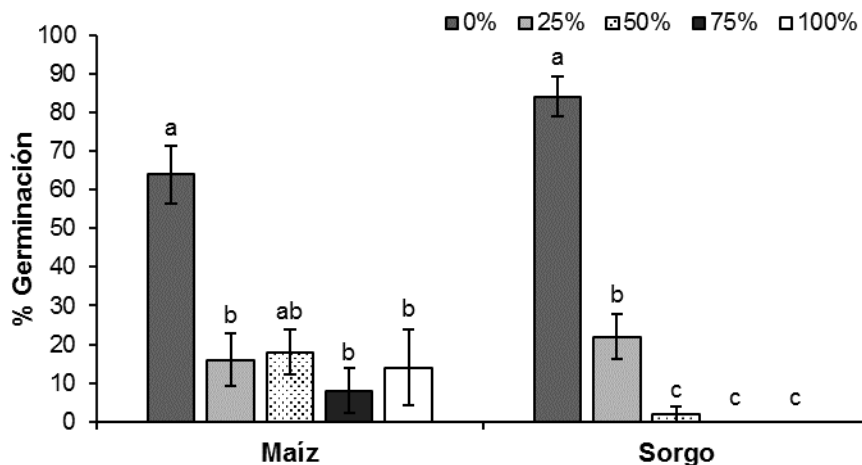
## **5.3 Efecto de las vinazas sobre la germinación de sorgo y maíz con diferentes concentraciones**

### **5.3.1 Porcentaje de germinación**

Los resultados en el tiempo del ensayo de germinación (Figura 11) mostraron que el mayor porcentaje de germinación, alrededor de 80%, se alcanzó en los tratamientos con agua (Vinaza 0%).) con alrededor de 80%. Seguido de vinaza 25% con una media de 36% de germinación y una media de 3.5% de germinación con vinaza 50% (únicamente 2 semillas germinadas). En los tratamientos con vinaza al 75 y 100% no hubo germinación en el caso de sorgo, mientras que en maíz sí, pero con una disminución de aproximadamente el 50% del porcentaje de germinación.

Estos resultados mostraron que la aplicación de vinazas inhibe el proceso de germinación de sorgo significativamente con respecto al control (agua), además de que a mayor concentración de vinaza el efecto negativo es mayor. En el caso de maíz se observó una significativa disminución inicial, pero a mayores concentraciones de vinaza (50%, 75% y 100%) no existió diferencia significativa en la disminución del porcentaje de germinación que se observó en estas concentraciones de vinaza.

La germinación de las semillas de sorgo y maíz se presentó en los primeros 4 días, ya que posterior a los 6 días no se observó un aumento significativo en el porcentaje de semillas germinadas, y no existió diferencia significativa entre 6 y 10 días (datos no mostrados).

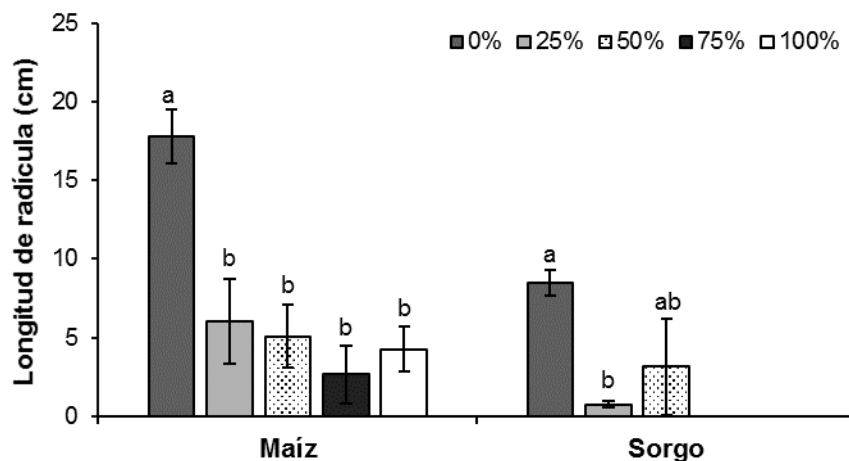


**Figura 11.** Comparación del porcentaje de germinación de sorgo y maíz con los cuatro tratamientos de vinaza. Diferentes letras minúsculas indican diferencia significativa entre tratamientos, para una misma especie para un nivel de significancia del 95%. Las barras representan la desviación estándar. n=5.

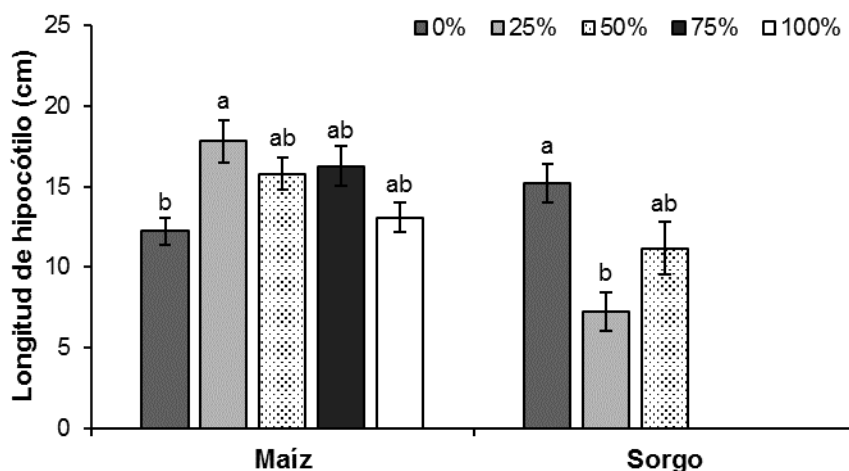
### 5.3.2 Crecimiento de radícula e hipocótilo

El análisis de la longitud de radícula arrojó resultados similares. En este caso se consideraron solamente las semillas germinadas, por lo cual no se muestran datos de concentración de 75 y 100% de sorgo donde no hubo germinación. La Figura 12 indica la longitud de radícula a los 10 días. Se observa una mayor longitud de maíz y de sorgo con agua que con vinazas a cualquier concentración ( $P < 0.05$ ). Mientras que en maíz no se observaron diferencias significativas en la longitud de radícula entre 25, 50, 75 y 100% de vinaza, en sorgo no hubo diferencias entre 25 y 50%, pero ya no existió germinación en 75% y 100%, por lo cual no se evaluó a estas concentraciones la longitud de radícula.

El comportamiento de la longitud de hipocótilo (Figura 13) a los 10 días fue diferente, en este caso la longitud del maíz se vio beneficiada con la aplicación de vinaza al 25% con respecto al control con agua (0%), sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las concentraciones probadas. Mientras que la longitud de hipocótilo del sorgo se vio significativamente inhibida con 25% de concentración de vinaza con respecto al control (0%), pero no con 50% ( $P > 0.05$ ).



**Figura 12.** Comparación de la longitud de radícula (cm) de las semillas germinadas de maíz y sorgo con los cinco tratamientos de vinaza. Diferentes letras minúsculas indican diferencia significativa entre tratamientos, para una misma especie para un nivel de significancia del 95%. Las barras representan el error estándar. n variable.



**Figura 13.** Comparación de la longitud del hipocótilo (cm) de las semillas germinadas de maíz y sorgo con los cinco tratamientos. Diferentes letras minúsculas indican diferencia significativa entre tratamientos, para una misma especie para un nivel de significancia del 95%. Las barras representan el error estándar. n variable.

### 5.3.3 Efecto de las vinazas en la germinación de semillas

Aunque aún no se ha estudiado el efecto de la vinaza tequilera en la germinación de gramíneas, varios autores (Ale *et al.*, 2008; Doke *et al.*, 2011; Pandey *et al.*, 2008; Ramana

*et al.*, 2002) han reportado una inhibición en la germinación y crecimiento inicial de algunas semillas en relación con un aumento en la concentración de efluentes de destilería aplicados. Además, estos autores reportaron que la tolerancia al efluente es diferente para cada planta y atribuyeron la inhibición de la germinación al alto contenido de sales, a la acidez, o a una acumulación de metales pesados.

En las vinazas utilizadas se tuvieron las características anteriores que pueden afectar a la germinación de semillas, tales como una alta concentración de  $\text{Na}^+$  (17.4 mg/L),  $\text{K}^+$  (366.0 mg/L),  $\text{Ca}^{2+}$  (1322.0 mg/L) y  $\text{Mg}^{2+}$  (231.8 mg/L), una concentración de sólidos disueltos totales (SDT) de 12.3 g/L y un pH de 3.7. González *et al.* (2014) encontraron una completa inhibición en la germinación de soya (*Glycine max*), trigo (*Triticum aestivum*) y quinoa (*Chenopodium quinoa*) usando vinaza alcoholera al 100%, pero a medida que se disminuyó la concentración y se ajustó el pH a 7, existió un mayor porcentaje de germinación, aunque el alargamiento radicular siguió siendo reducido. Ale *et al.* (2008) también encontraron una disminución en el porcentaje de germinación de trigo y arroz (*Oryza sativa*) con un aumento en la concentración de efluente de destilería a partir de 544 mg/L de  $\text{K}^+$ . Doke *et al.* (2011) llegaron a la misma conclusión al aplicar efluente de destilería con 720 mg/L de SDT a semillas de sorgo (*Sorghum cernuum*). El mismo comportamiento encontraron Pandey *et al.* (2008) al estudiar la germinación de maíz y arroz con efluente de destilería a diferentes concentraciones (50% y 100%), en el que se redujo tanto la germinación de ambas semillas como la longitud de radícula e hipocótilo. Esto es similar a lo que se encontró en el presente trabajo para maíz y sorgo.

La concentración de cationes en las vinazas puede tener un efecto negativo en la integridad de la membrana plasmática celular; sin embargo, la presencia de cationes de Mg, Na y K es más tóxica, mientras que el Ca disminuye la toxicidad (Tobe *et al.*, 2002). Esto ocurre ya que estos cationes pueden desplazar el Ca que se encuentra en la membrana celular y afectar su integridad y permeabilidad. La germinación y el crecimiento inicial de maíz (Carpici *et al.*, 2009) y sorgo dulce (Almodares *et al.*, 2007) han sido afectadas negativamente con un aumento en la concentración de sodio desde 1150 mg/L y 2300 mg/L, respectivamente, aunque algunos cultivares de la misma especie fueron afectados menos que otros.

Otro factor que se encuentra en las vinazas es la alta concentración de compuestos fenólicos. En las vinazas utilizadas la concentración de fenoles totales fue de 344.8 mg/kg. Muscolo *et al.*, (2013) estudiaron diferentes extractos de materia orgánica en el suelo con relación a la germinación de semillas de *Pinus laricio*, *Pinus halepensis*, *Cichorium intybus* y *Lens culinaris*, y concluyeron que los ácidos fenólicos inhibieron entre un 25 y 40% de la germinación, mientras que en este estudio la disminución en la germinación fue de hasta 75% y en el crecimiento de radícula de hasta 70% en este estudio. Ellos reportaron que los compuestos mayoritarios fueron ácido siríngico y ferúlico. El ácido ferúlico fue también uno de los compuestos fenólicos identificados en la vinaza tequilera del presente estudio.

En la germinación de lechuga, Li *et al.* (1993) encontraron una inhibición de la germinación entre el 70 y 100% con concentraciones de 740 a 970 mg/L de ácido trans-cinámico (100% de inhibición), cumárico, cafeico y ferúlico (70% inhibición) y además se comprobó que el efecto inhibitorio de estos compuestos podía ser aditivo o contraponerse dependiendo del compuesto y la concentración. En un estudio con maíz (Devi y Prasad, 1992), se encontró que a partir de concentraciones de 388 mg/L de ácido ferúlico, disminuyó el crecimiento inicial de maíz (longitud y biomasa) hasta un 80%, relacionado con una disminución en la actividad de enzimas involucradas con la germinación, la adquisición de nutrientes y la respiración, entre otras (fosfatasa, maltasa, amilasa, proteasa).

En el presente trabajo, ambas semillas, de maíz y sorgo sufrieron una inhibición en la germinación y crecimiento inicial explicado por la cantidad de sales y compuestos fenólicos principalmente, sin embargo, la variedad de maíz utilizada presentó una mayor resistencia a las vinazas que sorgo. Las plantas de maíz presentan además una asociación con HMA, con beneficios en términos de biomasa y área foliar (Celebi *et al.*, 2010; Gerdemann, 1964) sobre todo en suelos deficientes de fósforo, por lo tanto, se decidió utilizar maíz como planta hospedera.



## 5.4 Evaluación del experimento en invernadero

### 5.4.1 Parámetros del suelo

El suelo se afectó de manera visible por el pH y la aplicación de materia orgánica. Para efectos de comparación con otros trabajos se calculó que la dosis de vinaza aplicada fue de 296.2 m<sup>3</sup>/ha a lo largo de 3 meses (de acuerdo con un área superficial de riego de 137.5 cm<sup>2</sup>) o 1184.9 m<sup>3</sup>/ha/año manteniendo la misma dosis de riego.



**Figura 14.** Macetas regadas con A (izquierda), con 4.5 – 60% (centro) y con 4.5 – 30% (derecha).

Se pudo observar el cambio en algunas características del suelo durante la aplicación de vinazas, pero no se evaluaron cuantitativamente. Se observó que al aumentar el porcentaje de materia orgánica se formaba una costra en la capa superior del suelo (Figura 14), se oscurecía, aumentaba su compactación y la retención de agua. El oscurecimiento del suelo puede deberse a la aplicación de fenoles y melanoidinas que están presentes en las vinazas y le dan esa coloración café, además del proceso de oxidación de materia orgánica. El cambio en la densidad aparente del suelo, porosidad y capacidad de retención de agua no se evaluaron en este proyecto.

La compactación y el aumento en la retención de agua debido a la aplicación de vinazas no ha sido ampliamente reportada en otros trabajos e incluso se ha encontrado lo contrario. Jiang *et al.* (2012) encontraron una disminución significativa de la densidad aparente del suelo de 1.26 g/cm<sup>3</sup> a 1.19 g/cm<sup>3</sup>, lo que indica un suelo con menos compactación durante la aplicación de vinaza por 3 años a 75 ton/ha/año. En el trabajo de Jiang *et al.* (2012) se utilizó una dosis aproximadamente 15 veces menor de vinaza (anualmente). Esto ocasiona que los resultados sean completamente diferentes e indica que los efectos negativos de las vinazas se presentan a dosis mayores.

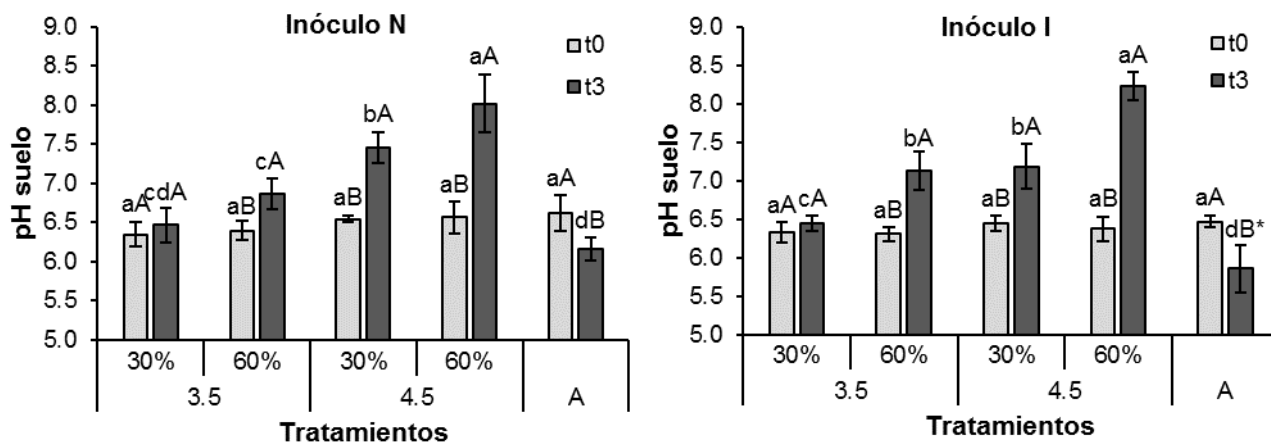
La importancia de una densidad aparente baja es que a mayores densidades se pueden generar condiciones anaerobias que disminuyen la biomasa en el suelo (Tejada *et al.*, 2007). Esto incluye a los HMA como demostraron Nadian *et al.* (1998) al no encontrar crecimiento de micorrizas arbusculares en un suelo altamente compactado (densidad aparente de 1.75 g/cm<sup>3</sup>) e incluso pueden representar una dificultad en el desarrollo de raíces en densidades mayores a 1.6 g/cm<sup>3</sup> (Brown y Wherret, 2017).

#### 5.4.1.1 pH

El pH del suelo aumentó significativamente en todos los tratamientos con vinazas con respecto al pH inicial. El tratamiento aplicado, el tiempo, la interacción tratamiento-tiempo y la interacción tratamiento-inóculo fueron significativos para el pH (*p-value*=0.0000 en los tres primeros y 0.0358 en el último). La diferencia del pH del suelo final se dio de la siguiente manera: A < 3.5 – 30% < 3.5 – 60% = 4.5 – 30% < 4.5 – 60% para el inóculo I y A <= 3.5 – 30% <= 3.5 – 60% < 4.5 – 30% < 4.5 – 60% para el inóculo N desde un pH promedio de 6.01 hasta 8.13 (Figura 15) mientras que el pH inicial fue 5.88 (Tabla 5. Caracterización fisicoquímica de suelo regado por vinazas.). El tipo de inóculo no tuvo un efecto significativo en el pH del suelo. En todos los tratamientos de riego con vinazas el pH fue mayor con respecto al pH inicial, después de tres meses.

El aumento de pH en el suelo se relaciona con el contenido de materia orgánica agregado como demostraron Marschner y Noble (2000) al agregar restos de plantas y Mokolobate y Haynes (2002) con varios residuos orgánicos. También se relaciona con otros compuestos agregados con la vinaza como sales. A mayor concentración de la vinaza se dio un mayor

pH del suelo. Durante el proceso de descomposición aerobia de la materia orgánica se puede llevar a cabo una descarboxilación de los ácidos orgánicos como oxalato, lactato, acetato y malato, lo cual produce un aumento significativo en el pH del medio como sugieren Yan *et al.* (1996). Estos ácidos se han encontrado en vinaza alcohólica de remolacha y caña de azúcar (Parnaudeau *et al.*, 2008).



**Figura 15.** Comparación del pH del suelo con los cinco tratamientos de vinaza (pH 3.5, 4.5, concentración de 30 y 60% y agua) y dos inóculos de HMA en tiempo inicial (t0) y a los tres meses (t3). Inóculo I es inóculo de INIFAP, inóculo N es inóculo nativo. Diferentes letras minúsculas indican diferencia significativa entre tratamientos, para un mismo inóculo y tiempo; diferentes letras mayúsculas indican diferencia significativa entre tiempos para un mismo tratamiento e inóculo; asterisco indica un valor significativamente menor entre inóculos para un mismo tratamiento y tiempo para un p-value < 0.05. Las barras representan la desviación estándar. n=6.

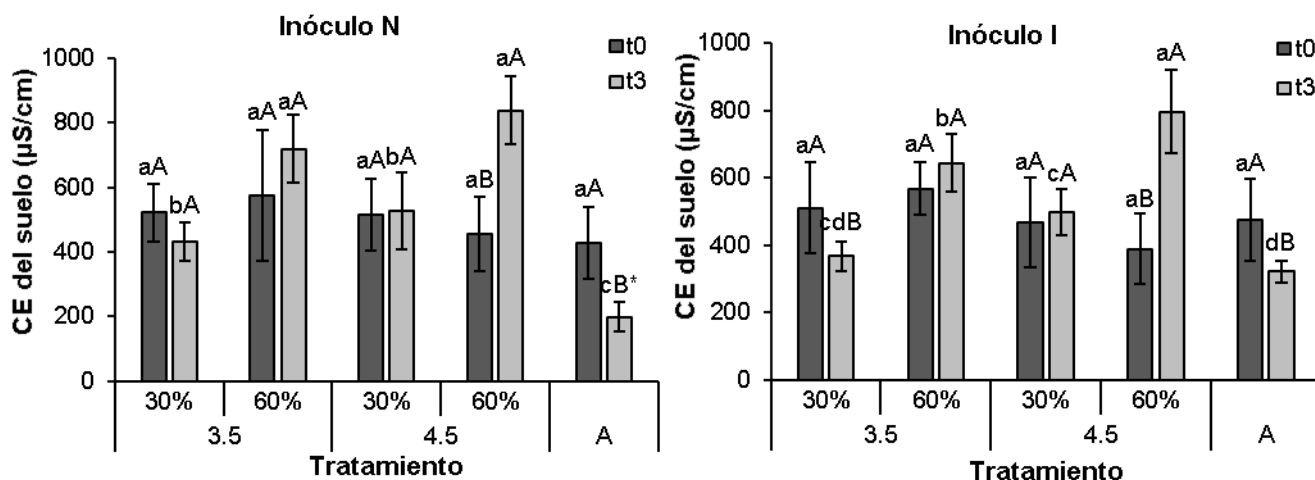
Por otro lado, Bessho y Bell (1992) encontraron un aumento de una unidad de pH relacionado con un incremento de calcio y magnesio en el suelo al aplicar enmiendas orgánicas. Debido a la acumulación de estos cationes presentes en la vinaza con los riegos sucesivos, esto pudiera ocasionar, en conjunto con la descomposición de materia orgánica, un aumento en el pH del suelo.

Vadivel *et al.* (2014) estudiaron los efectos de la aplicación de vinazas en el suelo y encontraron una disminución inicial del pH atribuida a la cantidad de iones hidrógeno libres presentes y un incremento posterior debido a la oxidación de la materia orgánica, saturación de bases intercambiables, reducción de Al intercambiable, alta capacidad buffer de la arcilla, presencia de sales débiles como carbonatos o bicarbonatos y la liberación de

caciones libres. En el presente experimento, el efecto de alcalinización se vio parcialmente disminuido por el pH ácido de la vinaza, ya que los tratamientos con pH de vinaza bajo (3.5) ocasionaron un pH del suelo aproximadamente una unidad menor que los tratamientos correspondientes con pH de vinaza alto (4.5) y misma concentración de materia orgánica.

#### 5.4.1.2 Conductividad

La conductividad eléctrica (CE) del suelo se comparó para los tratamientos con el inóculo N y el inóculo I con resultados similares. Se encontró que tanto el tiempo como el tratamiento y la combinación de ambos tienen un efecto significativo en la CE.



**Figura 16.** Comparación de la conductividad eléctrica del suelo con los cinco tratamientos de vinaza (pH 3.5, 4.5, concentración de 30 y 60% y agua) y dos inóculos de HMA en tiempo inicial (t0) y a los tres meses (t3). Inóculo I es inóculo de INIFAP, inóculo N es inóculo nativo. Diferentes letras minúsculas indican diferencia significativa entre tratamientos, para un mismo inóculo y tiempo; diferentes letras mayúsculas indican diferencia significativa entre tiempos para un mismo tratamiento e inóculo; asterisco indica un valor significativamente menor entre inóculos para un mismo tratamiento y tiempo para un p-value < 0.05. Las barras representan la desviación estándar. n=6.

La CE del suelo inicial fue de 234 µS/cm (Tabla 5. Caracterización fisicoquímica de suelo regado por vinazas.) y se observó (Figura 16) que el suelo en t0 fue mayor debido a que durante un mes se regaron las plantas con agua potable (no desionizada). Posteriormente, en el tratamiento 3.5–30% hubo una disminución significativa en el tiempo de la CE (sólo para I), sugiriendo que la planta tomó lo que se iba agregando con la vinaza y posiblemente

un poco de lo que había previamente en el suelo (considerando que no hubo lixiviación de sales porque no se regó a lixiviación durante el experimento). En el tratamiento con agua hubo una disminución significativa de la CE en el tiempo con ambos inóculos, lo cual indicó que la planta asimiló lo que había de sales en el suelo a falta de una fertilización.

Al finalizar el experimento los suelos tratados con 3.5 – 30% (inóculo I) y A tuvieron una similar conductividad ( $P > 0.05$ ), indicando una asimilación de sales por la planta y no una acumulación de sales en el suelo por el tratamiento de vinaza añadido. Además, el tratamiento de A al tiempo t3 con inóculo N tuvo una menor conductividad eléctrica que el del inóculo I. Esto sugiere que el inóculo N posiblemente tuvo un efecto en la asimilación de sales de la planta.

Al finalizar el experimento los suelos tratados con 3.5–30% (inóculo I) y A tuvieron una conductividad similar ( $P > 0.05$ ), indicando una asimilación de sales por la planta y no una acumulación de éstas en el suelo por el tratamiento de vinaza añadida por la planta.

Esto es soportado por los hallazgos reportados por Alloush *et al.* (2000). Estos autores encontraron que al agregar materia orgánica y utilizar HMA aumentó la captación de cationes como K y Ca por plantas de garbanzo (*Cicer areitinum*), en la planta y en menor medida de Mg con respecto a tratamientos sin HMA y sin materia orgánica.

Por otro lado, la conductividad del tratamiento 4.5–60% aumentó aproximadamente al doble con el tiempo (desde 454 a 838  $\mu\text{S}/\text{cm}$  con inóculo N y de 388 a 796  $\mu\text{S}/\text{cm}$  con inóculo I). Aún así, está en la categoría de efectos despreciables de la salinidad (1000  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000.

El factor que parece tener una mayor influencia en la conductividad final del suelo es la concentración de vinaza, ya que ambos tratamientos con mayor concentración (3.5–60% y 4.5–60%) fueron los de mayor conductividad con respecto a los de menor concentración ( $P < 0.05$ ).

La conductividad eléctrica del suelo está directamente relacionada con la concentración de sales en el mismo y en estudios anteriores se ha observado un incremento en la salinidad de un suelo regado con vinazas de remolacha (con mayores dosis de riego) (Madejón *et al.*, 2001). En el estudio de Madejón *et al.* (2001) tuvieron conductividades de hasta 3500  $\mu\text{S}/\text{cm}$  con el riego de vinaza en comparación con 2250  $\mu\text{S}/\text{cm}$  en el control. Sin embargo,

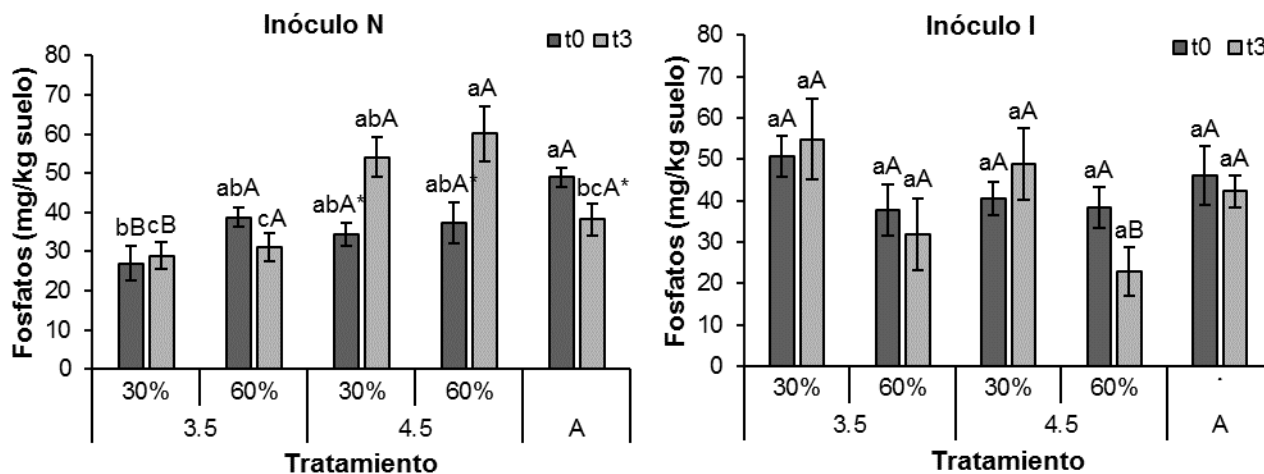
en el presente proyecto, la salinidad tiene efectos despreciables ( $1000 \mu\text{S}/\text{cm}$ ) de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT-2000, incluso en el tiempo 3.

Se estimó que con todos los riegos de vinaza se adicionó una concentración total de  $13.2 \text{ mg}/\text{kg}$  de suelo de Na,  $138.4 \text{ mg}/\text{kg}$  de K,  $340.6 \text{ mg}/\text{kg}$  de Ca y  $79.5 \text{ mg}/\text{kg}$  de Mg con riego al 30% y  $26.4 \text{ mg}/\text{kg}$  de Na,  $276.8 \text{ mg}/\text{kg}$  de K,  $681.1 \text{ mg}/\text{kg}$  de Ca y  $158.9 \text{ mg}/\text{kg}$  de Mg con riego al 60% de vinaza. Esto indica que la menor concentración de cationes es de sodio y la mayor de calcio. Para determinar el efecto de la proporción de estas sales en las plantas se calculó también la tasa de absorción de sodio (RAS) y el porcentaje de sodio intercambiable (PSI). A partir de las concentraciones de cationes y una concentración de  $\text{CO}_3$  (Marino-Marmolejo *et al.*, 2015) de  $3200 \text{ mg}/\text{L}$  se obtuvo un RAS de 0.903 y 0.566 al 60% y 30% de vinaza, además de un PSI de 0 en ambas concentraciones de vinaza. Esto indica que no hay una toxicidad asociada con sodio ni un efecto negativo con la permeabilidad (Ayers y Westcot, 1976).

Sin embargo, aunque el suelo no esté clasificado como suelo salino en la duración de este experimento (tres meses de aplicación de vinazas únicamente) y los valores de RAS y PSI sean bajos, la acumulación de sales a largo plazo puede ocasionar un problema de salinidad creciente o severo (CE del agua entre  $750 \mu\text{S}/\text{cm}$  y  $3000 \mu\text{S}/\text{cm}$ , y mayor a  $3000 \mu\text{S}/\text{cm}$ , respectivamente) y afectar la disponibilidad de agua de planta si se utiliza la vinaza como agua de riego, de acuerdo a Ayers (Tabla 1).

#### 5.4.1.3 Concentración de fósforo disponible

Las variaciones en la concentración de fósforo disponible medido como fosfatos  $[\text{PO}_4]$  en el suelo después de la aplicación de vinazas se observan en la Figura 17. Únicamente tuvo un efecto significativo la interacción tratamiento x inóculo.



**Figura 17.** Comparación de la concentración de fosfatos en el suelo con los cinco tratamientos de vinaza (pH 3.5, 4.5, concentración de 30 y 60% y agua) y dos inóculos de HMA en tiempo inicial (t0) y a los tres meses (t3). Inóculo I es inóculo de INIFAP, inóculo N es inóculo nativo. Diferentes letras minúsculas indican diferencia significativa entre tratamientos, para un mismo inóculo y tiempo; diferentes letras mayúsculas indican diferencia significativa entre inóculos para un mismo tratamiento y tiempo; asterisco indica un valor significativamente menor entre tiempos para un mismo tratamiento e inóculo para un p-value < 0.05. Las barras representan el error estándar. n=6.

La concentración de PO<sub>4</sub> encontrada en la caracterización inicial en El Arenal fue de 28.34 mg/kg (Tabla 5. Caracterización fisicoquímica de suelo regado por vinazas), y en todos los tratamientos se encontró mayor o la misma concentración en el t0. En los tratamientos a pH de 4.5 con inóculo N se vio una acumulación de fosfatos significativa en el tiempo, encontrando mayor concentración de PO<sub>4</sub> en el tratamiento 4.5–60% seguido por el tratamiento 4.5–30%. Ambos tratamientos también son los que presentan mayor pH del suelo (Figura 15) y concentración de fenoles totales como se observa en la

Figura 18.

Se sabe que a mayor pH del suelo aumenta la movilidad del fósforo en el suelo, además de que el aumento en la concentración de fenoles totales (provenientes de las vinazas) puede dar como resultado una disminución en la capacidad de la planta de asimilar el fósforo disponible y otros nutrientes (Lyu *et al.*, 1990), dando como resultado acumulación de fósforo en el suelo.

En las plantas inoculadas con I, el pH o la materia orgánica de las vinazas no tuvieron un efecto significativo sobre la concentración de PO<sub>4</sub> en el tiempo. Sin embargo, el tratamiento

3.5–30% con inóculo I (en ambos tiempos, t0 y t3), tuvo mayor concentración de PO<sub>4</sub> que para el mismo tratamiento inoculado con N. Contrariamente, el tratamiento 4.5–60% con inóculo N en t3 tuvo una mayor [PO<sub>4</sub>] que este mismo tratamiento inoculado con I.

Diferentes especies de HMA pueden ayudar a la planta en mayor o menor medida en la adquisición de nutrientes del suelo y en otras actividades (Newsham *et al.*, 1995). La eficiencia en adquisición de fósforo es una de las principales ventajas de la colonización de HMA en la planta, lo cual se ha visto que se puede lograr por un aumento en la actividad de la fosfatasa en las raíces.

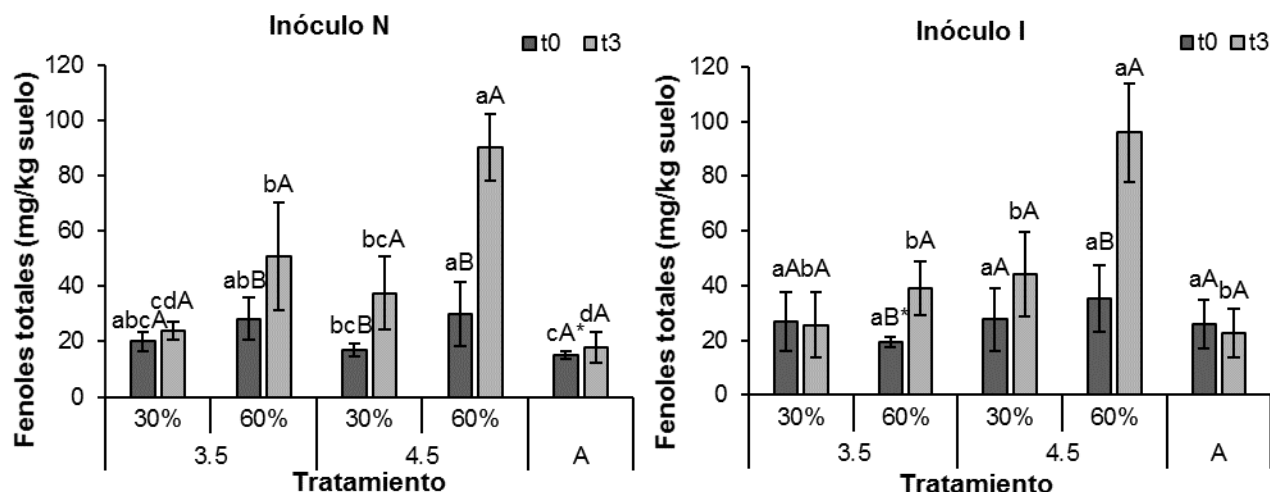
*Rhizophagus intraradices* es una especie muy eficiente para la planta ya que se ha observado que puede hidrolizar el fósforo que se encuentra en forma orgánica (Koide y Kabir, 2000), así que la planta puede recibir más fosfatos gracias a este inóculo aunque la presencia de compuestos fenólicos inhiba su capacidad de asimilar fosfatos directamente.

#### 5.4.1.4 Concentración de fenoles totales

En este trabajo se evaluó la concentración de fenoles totales en el suelo [FT] como equivalentes de ácido gálico (Figura 18). En este parámetro se observó que los factores tratamiento, tiempo y las interacciones tratamiento x inóculo, tratamiento x tiempo y tratamiento x inóculo x tiempo son significativas.

Los tratamientos regados con agua (A) dieron un promedio de 20.50 mg/kg suelo al inicio y 20.29 mg/kg suelo al final, lo cual indica que la concentración de fenoles totales presentes previamente en el suelo se mantuvo constante a lo largo del experimento. Sin embargo, la concentración de FT en el suelo muestreado de El Arenal era de 28.33 mg/kg (Tabla 5. Caracterización fisicoquímica de suelo regado por vinazas) y en todos los tratamientos en t0 había menos que eso con excepción del tratamiento de 4.5–60% I, así que pudo haber existido una degradación de los compuestos fenólicos durante el mes de establecimiento de la planta y previo a aplicar el tratamiento del riego con vinaza, es decir antes del t0.





**Figura 18.** Comparación de la concentración de fenoles totales (eq. ácido gálico) en el suelo con los cinco tratamientos de vinaza (pH 3.5, 4.5, concentración de 30 y 60% y agua) y dos inóculos de HMA en tiempo inicial (t0) y a los tres meses (t3). Inóculo I es inóculo de INIFAP, inóculo N es inóculo nativo. Diferentes letras minúsculas indican diferencia significativa entre tratamientos, para un mismo inóculo y tiempo; diferentes letras mayúsculas indican diferencia significativa entre tiempos para un mismo tratamiento e inóculo; asterisco indica un valor significativamente menor entre inóculos para un mismo tratamiento y tiempo para un p-value < 0.05. Las barras representan la desviación estándar. n=6.

Desde el primer riego (t0) se observaron diferencias significativas en el inóculo N donde 4.5–60% tuvo una concentración de FT significativamente mayor a los tratamientos 4.5–30% y A. En los tratamientos con vinazas, después del primer riego en el t0 se observó una concentración de fenoles totales desde 16.92 (4.5–30% N) hasta 35.34 mg/kg suelo (4.5–60% I). Al finalizar los tres meses del tratamiento el suelo alcanzó valores entre 23.88 y 95.92 mg/kg suelo, correspondientes a los tratamientos 3.5–30% N y 4.5–60% I, respectivamente, y los tratamientos que aumentaron su concentración en el tiempo fueron 3.5–60%, 4.5–30% y 4.5–60% para ambos inóculos (I y N), que son los de mayor concentración y mayor pH del suelo al final. Mientras que la concentración de fenoles totales en los tratamientos 3.5–30%, 3.5–60% y 4.5–30% al t3 no fue significativamente diferente al tratamiento con agua para el inóculo I. Esto sugirió una posible mayor degradación de los compuestos fenólicos en estas condiciones.

De acuerdo con la concentración de fenoles totales de la vinaza, la dosis y la cantidad de riegos se calculó la concentración de fenoles totales agregados con la vinaza. Este valor se sumó al valor promedio de fenoles totales presente en el suelo caracterizado y se obtuvo la concentración acumulada de FT por los riegos durante 3 meses de experimentación (Tabla 9).

**Tabla 9.** Concentración de fenoles totales acumulada por el riego de vinazas en la experimentación.

pH	MO	[FT] acumulada *(mg/kg suelo)	
		t0	t3
3.5	30%	39.1 ± 4.6	263 ± 4.6
3.5	60%	49.8 ± 4.6	497.6 ± 4.6
4.5	30%	39.1 ± 4.6	263 ± 4.6
4.5	60%	49.8 ± 4.6	497.6 ± 4.6
A		28.3 ± 4.6	28.3 ± 4.6

\*Suma de la concentración adicionada con los riegos de vinaza con la concentración presente en el suelo. Media de la concentración de compuestos fenólicos totales equivalentes a ácido gálico. La desviación es desviación estándar.

Se puede apreciar de la Tabla 9 y la

Figura 18 que las concentraciones de FT encontradas en el suelo para todos los tratamientos, fueron mucho menores a la adicionada con los riegos de vinaza. Dicha diferencia (entre la concentración de FT acumulada y la medida) sugiere una degradación de compuestos fenólicos durante el experimento. Probablemente existió una degradación de fenoles por la planta de maíz, tal como ha sido observado por Shreenivasa *et al.* (2011) en raíces de tomate. Los HMA no juegan un papel directo en la degradación de compuestos fenólicos ya que no utilizan los compuestos orgánicos del suelo como fuente de carbono; sin embargo, pueden inducir cambios en la actividad de la planta. Por ejemplo, Shreenivasa *et al.* (2011) reportaron una mayor actividad de polifenol oxidasa (25.8% más) en plantas micorrizadas con *Rhizophagus fasciculatus* (citado como *Glomus fasciculatum*) que las no micorrizadas.

Las enzimas fenol oxidasas, tal como la lacasa, son importantes en la degradación de fenoles tanto para su polimerización (humificación), degradación de lignina, solubilización, como para mitigar la toxicidad de los compuestos fenólicos, entre otros. Generalmente su producción está asociada a hongos basidiomicetos y ascomicetos, pero también pueden ser producidos por bacterias (Sinsabaugh, 2010) y se encuentran en plantas (Dwivedi *et al.*, 2011).

La actividad de enzimas de tipo fenol oxidasas se restringe a diferentes características del suelo, entre los que están humedad, temperatura, pH y concentración del sustrato (Floch *et al.*, 2007; Sinsabaugh, 2010). Algunos estudios señalan que hay muy poca actividad a pH arriba de 5.5 o debajo de 3.5 (Bending y Read, 1997) o que disminuye al aumentar el pH hasta una casi nula actividad en pH mayor a 7 (Floch *et al.*, 2007). En este trabajo, el aumento de pH en el suelo observado en algunos tratamientos se correlacionó positivamente con una mayor concentración de fenoles, es decir, una menor degradación de compuestos fenólicos probablemente por la disminución en la actividad de fenol oxidasas.

Por otro lado, se han reportado levaduras degradadoras de fenoles tales como *Candida tropicalis* que puede degradar completamente el fenol en aproximadamente 22 horas (Aday *et al.*, 2006). Este género de levadura y otros fueron encontrados por Lachance (1995) durante la producción del tequila, entre ellas están *Candida krusei*, *C. milleri*, *Clavispora lusitaniae*, *Metschnikowia agaveae*, *Hanseniaspora* spp., *Pichia kluyveri*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Hanseniaspora* spp., *Zygosaccharomyces bailii*, *Brettanomyces* spp. y *Pichia membranaefaciens*. Gschaedler *et al.* (2000) también reportaron levaduras de los géneros *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia* y *Saccharomyces* durante la producción de tequila.

Hofmann y Schauer (1988) encontraron que algunas especies de los géneros *Candida* y *Pichia* (ambos encontrados en la producción de tequila) utilizan octano, hexadecano y fenol como fuentes de carbono y energía. Además *Kluyveromyces* y *Saccharomyces* han sido reportadas como degradadoras de polifenoles (Laconi *et al.*, 2007; Patel y Rajkumar, 2009). Por lo tanto, es muy probable que las levaduras presentes en las vinazas como remanentes de la fermentación y agregadas al suelo con los riegos, tengan la capacidad de degradar compuestos fenólicos.

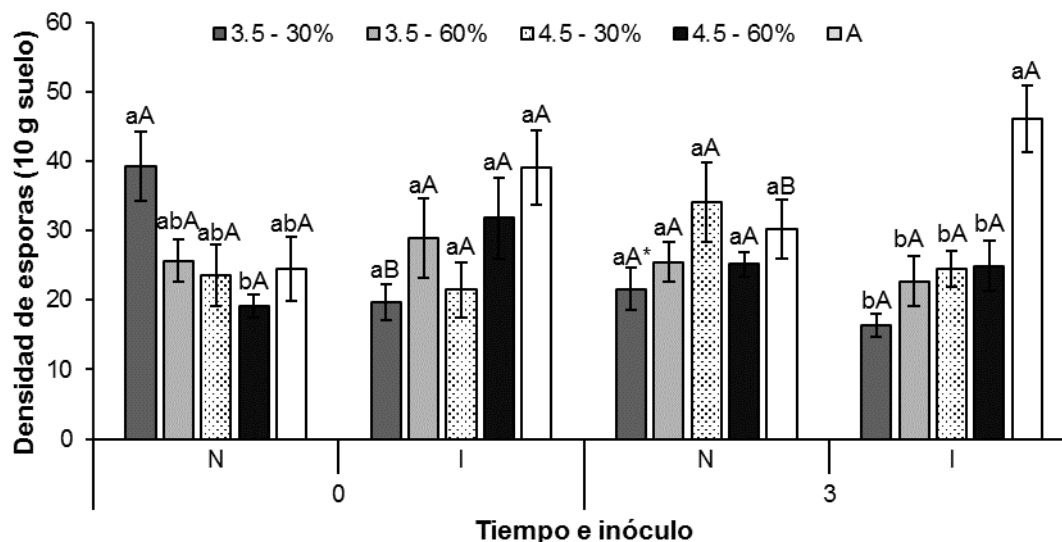
Debido a lo explicado anteriormente se pudo observar que puede existir una actividad degradadora de compuestos fenólicos por los microorganismos presentes y la asociación con HMA; sin embargo, un pH ligeramente alcalino (pH del suelo hasta 8), es una condición menos adecuada para la actividad de enzimas degradadoras de compuestos fenólicos. La acumulación de FT en el suelo puede llegar a concentraciones de algunos

compuestos fenólicos presentes en estas vinazas que pueden llegar a ser tóxicas para los mismos microorganismos, HMA y la planta.

## 5.4.2 Simbiosis micorrízica

### 5.4.2.1 Densidad de esporas de HMA

La densidad de esporas de HMA encontrada no fue significativamente diferente en el tiempo ni entre inóculos, pero se vio afectada por el tratamiento ( $p$ -value=0.0001) y por la interacción del tiempo e inóculo con el tratamiento (0.0028 y 0.0008, respectivamente). En la Figura 19 se puede ver que al inicio no hay diferencias significativas, solamente la densidad de esporas de HMA en las macetas del tratamiento 3.5–30% con inóculo N fue significativamente mayor que en las macetas del mismo tratamiento inoculadas con I. En general, todos los tratamientos iniciaron el experimento en las mismas condiciones.



**Figura 19.** Comparación de la densidad de esporas en el suelo (esporas por 10 g de suelo) con los cinco tratamientos de vinaza (pH 3.5, 4.5, concentración de 30 y 60% y agua) y dos inóculos de HMA en tiempo inicial (t0) y a los tres meses (t3). Inóculo I es inóculo de INIFAP, inóculo N es inóculo nativo. Diferentes letras minúsculas indican diferencia significativa entre tratamientos, para un mismo inóculo y tiempo; diferentes letras mayúsculas indican diferencia significativa entre inóculos para un mismo tratamiento y tiempo; asterisco indica un valor significativamente menor entre tiempos para un mismo tratamiento e inóculo para un  $p$ -value < 0.05. Las barras representan el error estándar. n=6.

En el inóculo I se observó una disminución en la densidad de esporas encontradas al final del experimento (t3) con el riego de vinazas, independientemente del pH evaluado (3.4 o 4.5) y de materia orgánica de las vinazas (30% o 60%). De la misma manera Nakatani *et al.* (2011) encontraron una disminución en la densidad de esporas del suelo al aplicar entre 9.0 y 22.6 Mg/ha de lodos de tenería, mientras que en el trabajo actual se aplicaron el equivalente de entre 28.8 y 57.5 Mg/ha de vinazas en base seca. Nakatani *et al.* (2011) explicaron este efecto negativo por un aumento en la disponibilidad de nutrientes, principalmente fósforo y nitrógeno, lo cual es contraproducente para el desarrollo de HMA. Algunos estudios han encontrado que no hay una disminución en la densidad de esporas por la aplicación de vinazas. Por ejemplo, Pereira Aleixo *et al.* (2014) no encontraron diferencias en la densidad de esporas en campos con aplicación de vinazas de caña y/o quema de la caña. Sin embargo, la dosis de vinaza fue de 100 m<sup>3</sup>/ha en una única aplicación, lo cual no representa la práctica observada en el predio El Arenal en el que se riegan vinazas continuamente.

En un estudio anterior a éste, Sánchez-Lizárraga, (2015a) mostró que efectivamente hay una disminución significativa en la densidad de esporas de HMA con el tiempo debida a la aplicación de vinazas tequileras. En ese trabajo, desde el primer mes de riego se observó una disminución significativa con una concentración de vinazas a partir del 25%, atribuida a la acumulación de sales. La dosis de vinaza aplicada (300 mL semanales por 4 meses) por Sánchez-Lizárraga (2015a) fue similar a la del presente estudio.

La densidad de esporas de HMA final con I fue menor en todos los tratamientos que en el control (agua), mientras que en N no se apreciaron diferencias significativas entre los tratamientos y el riego con agua (Figura 19). Existen reportes que sugieren una adaptación a las condiciones ambientales de los consorcios micorrízicos nativos del sitio (Henkel *et al.*, 1989; Lambert *et al.*, 1980), por lo que se puede suponer que el inóculo N es más resistente o está adaptado al riego con vinazas. Por otro lado, algunos trabajos han reportado que el uso de inóculos comerciales en comparación con inóculos nativos es menos eficiente posiblemente por la baja eficiencia de los propágulos o menor cantidad de propágulos a lo declarado en el empaque y a que las especies nativas responden mejor a la simbiosis que un

inóculo comercial (sobre todo cuando este último es de una sola especie) (Rowe *et al.*, 2007; Tarbell y Koske, 2007).

#### 5.4.2.2 Abundancia relativa de especies

La identificación taxonómica de las esporas al final del experimento (t3) mostró que en algunas especies hubo una reducción y en otras un aumento de la abundancia relativa (AR) al aplicar las vinazas con respecto al control y al consorcio inoculado como se puede observar en la Tabla 10. (Fotografías en Anexo A).

**Tabla 10.** Abundancia relativa del inóculo propagado (inoculado) y al final del experimento t3.

Especie HMA	Propagado	Tratamiento				
		A	3.5 - 30%	3.5 - 60%	4.5 - 30%	4.5 - 60%
<i>Claroideoglopus etunicatum</i>	70.4%	50.3%	55.7%	69.1%	74.9%	65.3%
<i>Funneliformis geosporum</i>	10.0%	6.1%	35.4%	15.7%	15.6%	14.6%
<i>Funneliformis mosseae</i>	10.6%	32.1%	0.0%	0.8%	0.0%	4.8%
<i>Acaulospora morrowiae</i>	0.0%	9.6%	4.8%	5.9%	4.1%	1.2%
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	0.8%	0.0%	3.1%	3.6%	5.0%	0.9%
<i>Diversispora spurca</i>	6.9%	1.0%	0.0%	0.0%	0.4%	0.9%
<i>Acaulospora mellea</i>	0.0%	0.0%	1.0%	0.0%	0.0%	5.4%
<i>Glomus macrocarpum</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	6.0%
<i>Acaulospora laevis</i>	0.0%	1.0%	0.0%	1.6%	0.0%	0.0%
<i>Septoglopus constrictum</i>	0.0%	0.0%	0.0%	2.4%	0.0%	0.0%
<i>Acaulospora spinosa</i>	1.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>Ambispora appendicula</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.9%
<i>Ambispora aff. gerdemannii</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.8%	0.0%	0.0%

La especie que se mantuvo después de la propagación con la mayor abundancia relativa fue *C. etunicatum*, seguida de *F. geosporum*, las cuales aumentaron su abundancia relativa en los tratamientos con vinaza con respecto al control. En la rizósfera de maíz se han reportado algunas especies de HMA en mayor abundancia, como son *Gigaspora gigantea*, *Rhizophagus albidus* (citado como *Glomus albidum*), *F. mosseae* (citado como *G. mosseae*) y *C. etunicatum* (citado como *G. etunicatum*) (Jansa *et al.*, 2006). En el presente trabajo, *A. scrobiculata* también tuvo mayor AR con vinaza que con agua, pero en todos los casos fue menor a 5%. Las demás especies presentaron una menor AR con la aplicación de vinazas

tequileras. En este trabajo *C. etunicatum* y *F. mosseae* fueron de las que tuvieron mayor AR, probablemente por ser afines a maíz. También *F. geosporum* y *A. morrowiae* tuvieron una AR alta.

En un trabajo previo Sánchez-Lizárraga, (2015a) encontró que *A. mellea*, *F. mosseae*, *A. scrobiculata* y *Paraglomus occultum* fueron resistentes a la aplicación de vinazas tequileras durante 3 meses, en simbiosis con *Chlorophytum comosum*. Con este antecedente y los resultados de este trabajo se encuentra en común que el género *Acaulospora* y la especie *F. mosseae* están entre las más resistentes a la aplicación de vinazas tequileras. Además, existen reportes de *Acaulospora* en suelos ácidos (4 a 4.5 de pH), por lo que podría presentar una adaptación a las condiciones de irrigación de vinazas.

En la Tabla 11 se observa la densidad de esporas por especie en el tiempo 3 (t3) de ambos inóculos en comparación al control con agua. La densidad de esporas de *C. etunicatum* es la que se aproxima más a la densidad de *R. intraradices*, pero solamente la suma de todas las especies en el inóculo N es igual o mayor a la DE del inóculo I, exceptuando el tratamiento con agua.

**Tabla 11.** Densidad de esporas (DE) por especie en t3.

Especie HMA	Densidad de esporas (10 g suelo)*				
	A	3.5 - 30%	3.5 - 60%	4.5 - 30%	4.5 - 60%
<i>Claroideoglopus etunicatum</i>	15.2	12.0	17.6	25.6	16.4
<i>Funneliformis geosporum</i>	1.8	7.6	4.0	5.3	3.7
<i>Funneliformis mosseae</i>	9.7	0.0	0.2	0.0	1.2
<i>Acaulospora morrowiae</i>	2.9	1.0	1.5	1.4	0.3
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	0.0	0.7	0.9	1.7	0.2
<i>Diversispora spurca</i>	0.3	0.0	0.0	0.1	0.2
<i>Acaulospora mellea</i>	0.0	0.2	0.0	0.0	1.4
<i>Glomus macrocarpum</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5
<i>Acaulospora laevis</i>	0.3	0.0	0.4	0.0	0.0
<i>Septoglopus constrictum</i>	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0
<i>Acaulospora spinosa</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Ambispora appendicula</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2
<i>Ambispora aff. gerdemannii</i>	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0
<b>Total inóculo nativo</b>	<b>30.2</b>	<b>21.6</b>	<b>25.5</b>	<b>34.1</b>	<b>25.1</b>
<i>Rhizophagus intraradices</i>					
<b>Inóculo comercial</b>	<b>46.1</b>	<b>16.4</b>	<b>22.7</b>	<b>24.5</b>	<b>24.9</b>

\* La DE de cada especie se calculó multiplicando la abundancia relativa por la DE total para cada tratamiento.

Se observó que la densidad de esporas (DE) de HMA de casi todas las especies del inóculo nativo fue menor que la densidad de esporas del inóculo comercial (I), pero la densidad de I disminuyó con los tratamientos posiblemente por ser más sensible a las vinazas y algunas del inóculo N (*C. etunicatum* y *F. geosporum*) presentaron una mayor densidad de esporas en condiciones perturbadas que en el riego con agua.

Algunos autores reportaron una mayor abundancia de HMA del género *Glomus sensu lato* en sitios con perturbaciones abióticas (salinidad), principalmente *F. mosseae*. Además, se ha observado una alteración en la distribución de la abundancia de especies de HMA con la salinidad indicando que algunas especies tienen una mayor resistencia que otras (Sylvia y Williams, 1992). Por ejemplo, *F. geosporum* se ha encontrado en ambientes altamente salinos de marismas (hasta 20.1 mS/cm) (Wilde *et al.*, 2009), lo cual explicaría por qué esta especie no se vio afectada negativamente por la adición de sales con la vinaza.

Por otra parte, el efecto de los compuestos fenólicos en el desarrollo de HMA también puede influir en la presencia o no de las especies de HMA en el suelo, y depende del compuesto fenólico y la concentración. Por ejemplo, a una concentración de 10  $\mu$ M (3 mg/L) de quercetina, *Gigaspora margarita* presentó un mayor crecimiento hifal que sin este compuesto (Bécard *et al.*, 1992), y además se ha encontrado este compuesto en exudados de raíces transformadas de zanahoria utilizadas para estudios *in vitro* con HMA (Bécard *et al.*, 1995). Sin embargo, a una concentración mayor sí hay un efecto negativo. Por ejemplo, el crecimiento hifal de *R. fasciculatum* se redujo un 66% por la adición de ácido ferúlico en dosis de 50 mg/kg (en comparación con agua) (Wacker *et al.*, 1990). En el presente trabajo, con la vinaza tequilera la concentración de fenoles totales en t3 llegó hasta 93.1 mg/kg de suelo en promedio con el tratamiento 4.5–60%, la cual puede ser una concentración más tóxica para algunas especies de HMA que para otras.

En general se ha reportado la aparición de distintos ecotipos de HMA formados bajo condiciones específicas de perturbación (Lenoir *et al.*, 2016), lo que explica que algunas especies del inóculo N estén más adaptadas a las condiciones de aplicación de vinazas que otras.



### 5.4.2.3 Riqueza y diversidad de especies

La riqueza de especies no fue muy alta en las muestras analizadas y, en el ANOVA llevado a cabo, no se encontraron diferencias significativas ni para la riqueza de especies (*valor-p*=0.2190) ni para la diversidad expresada como el índice de diversidad de Shannon (H) (*valor-p*=0.1262).

En la Tabla 12 se observa que la riqueza fue entre 2 y 5 especies para los tratamientos, y la diversidad con el índice de Shannon (H) fue de entre 0.36 y 0.99. Esta riqueza y diversidad fueron bajas comparadas con otros estudios de HMA en caña de azúcar en condiciones de perturbación por quema de residuos del cultivo en campo. De Azevedo *et al.*, (2014) reportaron una riqueza de especies de 6.50 en suelos sin quema y 7.44 en suelos con quema, además de un índice de Shannon de 1.5 en suelo sin quema y 1.57 en suelos con quema. Esto es esperable ya que al introducir un consorcio del campo a una planta hospedera diferente en invernadero, las condiciones son controladas. Sin embargo, en el estudio realizado por Nakatani *et al.* (2011) se reportó que la riqueza de especies de HMA disminuyó al aplicar al suelo lodos de tenería en dosis incrementales y la diversidad fue significativamente menor en las dosis altas de lodos (H de Shannon de 1.74) de tenería respecto a un control sin lodos (H=2.00). Wilde *et al.* (2009) también reportó que la diversidad y riqueza de especies de HMA fue baja en dos marismas estudiadas donde prevalecía una alta salinidad (hasta 20.1 mS/cm).

La diversidad de especies en este trabajo es baja probablemente debido a que el sitio de estudio ya había sido perturbado con el riego previo de vinazas tequileras y es probable que las especies presentes son las que podrían presentar una adaptación a las condiciones del sitio, lo que provocó que la riqueza y diversidad no se vieran afectadas durante el experimento.

**Tabla 12.** Riqueza y diversidad de especies para t3

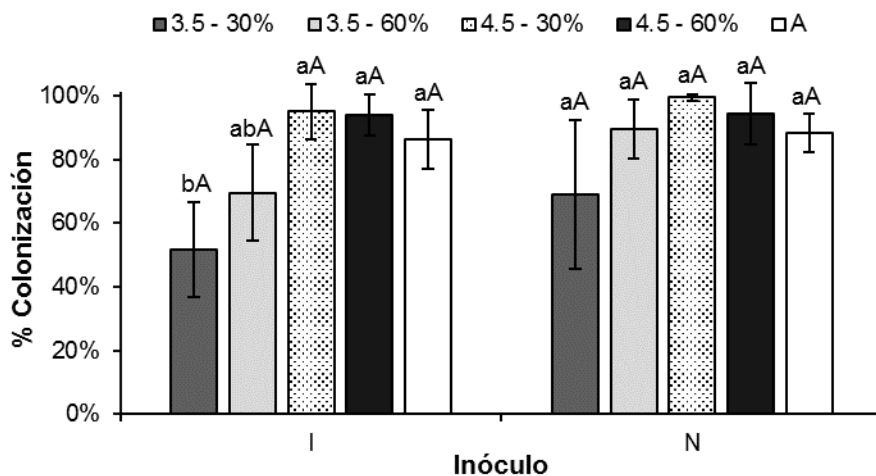
<b>Tratamiento</b>	<b>Riqueza de especies</b>	<b>Diversidad Índice de Shannon (H)</b>
A	3.3 ± 1.5	0.56 ± 0.39
4.5 - 60%	4.7 ± 1.2	0.99 ± 0.2
4.5 - 30%	4.3 ± 0.6	0.76 ± 0.29

3.5 - 60%	5 ± 1.7	0.95 ± 0.09
3.5 - 30%	2.3 ± 1.5	0.36 ± 0.34
Propagado	4 ± 1	0.81 ± 0.27

#### 5.4.2.4 Porcentaje de colonización

La colonización solamente se vio afectada por el tratamiento, mientras que el inóculo no tuvo un efecto significativo estadísticamente hablando aunque sí parece más sensible que el inóculo N. El tratamiento de 3.5-30% fue el que presentó una menor colonización que los demás tratamientos e incluso el riego con agua, con ambos inóculos ( $p < 0.05$  para inóculo I). En ambos inóculos se observa una tendencia en la que el mayor porcentaje de colonización se obtiene con el tratamiento 4.5-30% (Figura 20).

El porcentaje de colonización fue menor en los tratamientos con vinaza ajustada a un pH de 3.5 y esto puede indicar que tiene un mayor efecto el cambio del pH al aplicar la vinaza y no tanto la concentración de materia orgánica. El pH del suelo muestreado inicialmente fue de 5.9 y con las sucesivas adiciones de vinaza el pH bajó en casi 2.5 unidades menos, lo cual puede ocasionar que el desarrollo de HMA se vea inhibido por los cambios en la solubilidad de nutrientes y la toxicidad de algunos metales, pero principalmente por la concentración de  $H^+$  (Medeiros *et al.*, 1994).



**Figura 20.** Comparación del porcentaje de colonización micorrízica con los cinco tratamientos de vinaza (pH 3.5 y 4.5, concentración de vinaza 30% y 60%) y dos inóculos de HMA a los tres meses. Inóculo I es inóculo de INIFAP, inóculo N es inóculo nativo. Diferentes letras minúsculas indican diferencia significativa entre tratamientos, para un mismo inóculo; diferentes letras mayúsculas indican diferencia significativa entre

inóculos para un mismo tratamiento para un p-value < 0.05. Las barras representan la desviación estándar. n=3.

Está comprobado que ambos procesos (esporulación y colonización) pueden disminuir o inhibirse ante una perturbación abiótica como son la cantidad de sales y de compuestos fenólicos presentes. Campagnac y Khasa (2014) observaron una disminución en el crecimiento hifal y ausencia de germinación de esporas al aumentar el estrés salino del medio en esporas de *Rhizophagus irregularis*.

Piotrowski *et al.* (2008) encontraron que la adición de desechos ricos en compuestos fenólicos disminuye el porcentaje de colonización por HMA. Fries *et al.* (1997) encontraron que a concentraciones de quercetina de 30 mg/kg suelo agregados cada cuatro días, se presentó una inhibición en la colonización de *R. intraradices* del 20% (en trébol) y 8% (en sorgo), pero a 7.5 mg/kg de suelo existió una estimulación de la colonización. Con las vinazas tequileras se agregaron entre 11 (30%) y 23 (60%) mg/kg de suelo de fenoles totales aproximadamente cada cinco días, concentraciones menores a las concentraciones inhibitorias de quercetina que incluso podrían estimular su colonización (Fries *et al.*, 1997) pero la concentración de fenoles totales en las vinazas es mayor.

### **5.4.3 Crecimiento del maíz con el riego de vinazas**

Después de dos meses de iniciado el tratamiento (tres meses de edad) la mayoría de las plantas habían alcanzado su etapa de floración y se comenzaron a formar algunas mazorcas (Figura 21). Al finalizar, la mayoría de las plantas presentaron síntomas de estrés por sequía. Las plantas de maíz fueron resistentes al tratamiento de vinazas, ya que la mayoría sobrevivieron los tres meses de riego (únicamente 5 plantas murieron en el último mes), teniendo un 91.7% de sobrevivencia global.

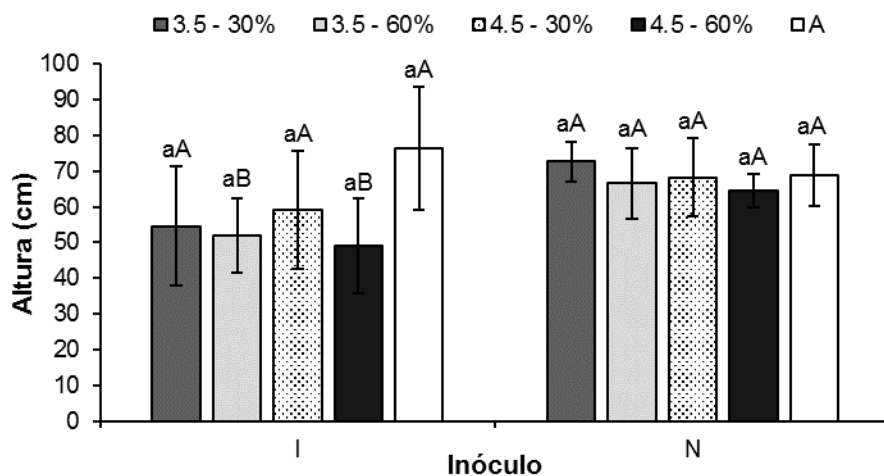
Las plantas alcanzaron solamente una altura promedio de 63 cm en 4 meses de edad y no se logró la formación de mazorcas por el estrés hídrico, ya que el crecimiento y desarrollo de maíz está fuertemente influenciado por los niveles de riego, de acuerdo con Cakir (2004).

Por otro lado, el análisis de varianza mostró que sí hay una diferencia significativa en la altura de las plantas respecto al tratamiento aplicado ( $p$ -value 0.0405) e inóculo (0.0033).

#### 5.4.3.1 Altura



**Figura 21.** Formación de espiga (izquierda) y mazorca (centro); plantas de maíz al finalizar el experimento (derecha)



**Figura 22.** Comparación de la altura de planta con los cinco tratamientos de vinaza (pH 3.5 y 4.5, concentración de vinaza 30% y 60%) y dos inóculos de HMA a los tres meses. Inóculo I es inóculo de INIFAP, inóculo N es inóculo nativo. Diferentes letras minúsculas indican diferencia significativa entre tratamientos, para un mismo inóculo; diferentes letras mayúsculas indican diferencia significativa entre inóculos para un mismo tratamiento para un  $p$ -value < 0.05. Las barras representan la desviación estándar.  $n=6$ .

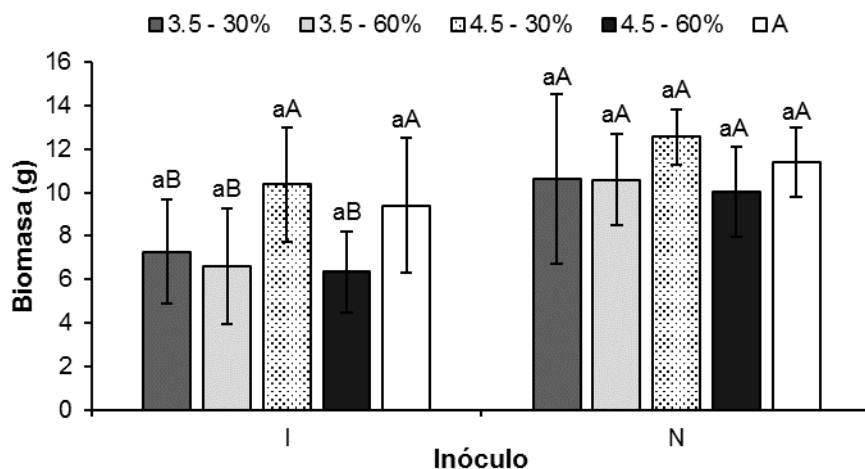
La Figura 22 muestra la altura final de las plantas de maíz con los dos inóculos y 5 tratamientos aplicados. Se observó que las plantas regadas con vinaza con el inóculo I en general tuvieron una menor altura que las regadas con agua, aunque no hubo diferencias significativas entre tratamientos con vinaza o con riego con agua.

Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas entre los inóculos en el tratamiento 4.5–60% y el 3.5–60%, ya que las plantas que crecieron más estaban inoculadas con N. Esto indica que, al aplicar una concentración más alta de vinazas al suelo, independientemente del pH, las plantas que estuvieron inoculadas con N tuvieron los mayores beneficios en altura. Esto puede ser debido a que el inóculo N se ve menos afectado por el tratamiento que el inóculo I por la ventaja de una mayor diversidad de especies, ya que las diferentes especies de HMA pueden proveer beneficios diferentes y tienen distintas estrategias para aprovechar nutrientes del suelo, y así su diversidad en conjunto es más beneficiosa para la planta hospedera (Kernaghan, 2005). En este caso, la densidad de esporas del inóculo N se vio menos afectada por las vinazas que la del inóculo I (Figura 19). Además, Oliveira *et al.* (2005) encontraron que, en un sitio perturbado por la disposición de residuos industriales alcalinos, los HMA nativos del sitio fueron más efectivos en el crecimiento de plantas que los no nativos. Tanto los nativos como no nativos eran de las mismas especies (*R. intraradices* y *F. mosseae*). Esto indica un mejor desempeño de la simbiosis con plantas nativas en condiciones de perturbación.

#### 5.4.3.2 Biomasa final

La biomasa se analizó por un ANOVA multifactorial y se encontraron diferencias significativas con respecto al tratamiento (*p-value* 0.0016) e inóculo utilizado (*p-value* 0.0000). La prueba de Tukey mostró que la biomasa fue significativamente menor en las plantas inoculadas con I que en las inoculadas con N. Esta prueba también mostró que la biomasa del tratamiento 4.5–60% fue significativamente menor al tratamiento A y 4.5 – 30% lo que indica un efecto negativo de la MO aplicada en la biomasa a altas concentraciones. Además, la biomasa en el tratamiento de 3.5–60% también fue menor a la del tratamiento 4.5–30%. Esto sugiere que la interacción de pH bajo con MO alta inhibe el

crecimiento de maíz respecto a una planta regada con pH más neutro y menor concentración de vinaza.



**Figura 23.** Comparación de la biomasa total de planta (g) con los cinco tratamientos de vinaza (pH 3.5 y 4.5, concentración de vinaza 30% y 60%) y dos inóculos de HMA a los tres meses. Inóculo I es inóculo de INIFAP, inóculo N es inóculo nativo. Diferentes letras minúsculas indican diferencia significativa entre tratamientos, para un mismo inóculo; diferentes letras mayúsculas indican diferencia significativa entre inóculos para un mismo tratamiento para un p-value < 0.05. Las barras representan la desviación estándar. n=6.

En la Figura 23 se observa que las plantas inoculadas con N en los tratamientos 3.5–30%, 3.5–60% y 4.5–60% obtuvieron mayores beneficios, ya que su biomasa fue significativamente mayor a las inoculadas con el inóculo I. Aunque no se aprecian diferencias significativas entre tratamientos sí se puede observar que la aplicación de vinaza en alta concentración (60%) tuvo un impacto negativo en el crecimiento de la planta.

Esta inhibición en el crecimiento puede atribuirse a la gran cantidad de compuestos fenólicos tales como el ácido ferúlico presente en las vinazas. De acuerdo con Bergmark *et al.* (1992), el ácido ferúlico a 250  $\mu\text{M}$  (48.6 mg/L) es un compuesto alelopático que puede inhibir el suministro de nitratos y amonio a plantas de maíz hasta en un 69%. Una concentración de 2.27 mM (440.8 mg/L) también puede inhibir el suministro de fósforo a plantas de pepino en un 50% (Lyu *et al.*, 1990). Blum *et al.* (1985) encontraron que al aplicar ácido ferúlico (0.5 mM o 97.1 mg/L) en un pH ácido (5.5) se disminuyó el consumo de agua de la planta de pepino, además de su peso seco en comparación con plantas en

condiciones de un pH neutro y sin ácido ferúlico. Las vinazas tequileras contienen una concentración hasta 20 veces mayor de fenoles totales y la disminución en el suministro de nutrientes puede tener un impacto directo en el crecimiento de las plantas. La biomasa también fue menor en trébol y sorgo al aplicar quercetina en 30 mg/kg suelo cada cuatro días de acuerdo a Fries *et al.* (1997), mientras que con las vinazas tequileras se agregaba una concentración cercana (23 mg/kg con vinaza al 60%) de fenoles totales aproximadamente cada cinco días.

La acumulación de sales en el suelo es un factor que también ha demostrado una inhibición en el crecimiento de las plantas, pero que puede ser disminuida en asociación con HMA. La conductividad eléctrica de las vinazas (2980  $\mu\text{S}/\text{cm}$  al 100%) tiene el potencial de disminuir el rendimiento de maíz hasta un 25% (Ayers y Westcot, 1976) al ser utilizada como agua de riego. La mayor toxicidad se asocia con el sodio ya que compite con el potasio en la membrana celular (Estrada *et al.*, 2013) aunque en este caso esté en una concentración baja (33.5 mg/L).

El efecto negativo de la salinidad puede ser disminuido en asociación con HMA. Se sabe que los HMA pueden realizar una selección de iones durante el suministro de nutrientes al suelo o en la transferencia a la planta y Estrada *et al.* (2013) observaron que un inóculo nativo de HMA de un sitio perturbado por alta salinidad promueve un mayor crecimiento como biomasa de maíz que un inóculo no nativo o una planta sin HMA.

Un posible mecanismo de resistencia al estrés salino de las plantas puede ser por el ácido salicílico que se produce en respuesta a la colonización por HMA (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007). Además, Gunes *et al.* (2007) encontraron una interacción significativa de la salinidad con la concentración de ácido salicílico en la biomasa de maíz, ya que al aplicar una concentración de 2300 mg/L de NaCl a macetas de maíz hubo una reducción de 36 a 23 g de peso seco de biomasa, pero al aplicar 1mM de ácido salicílico, las plantas sujetas a estrés salino aumentaron su biomasa hasta 33 g aproximadamente.

Además del efecto de la materia orgánica, en la Figura 23 también se observa que las plantas de los tratamientos de pH 3.5 tuvieron una menor biomasa que las regadas con agua. De acuerdo a Ayers y Westcot (1976), un agua de riego con pH menor a 6.5 puede presentar problemas en cuanto a nutrición o toxicidad.

Por último, aunque la biomasa total de la planta sí presentó diferencias significativas, la biomasa de la raíz no presentó diferencias entre tratamientos debido a que las raíces delgadas no contribuyen significativamente a la biomasa total de la raíz comparándolas con las raíces gruesas principales. Las diferencias entre raíces se podían apreciar a simple vista observando un mayor desarrollo radicular con una mayor cantidad de raíces más delgadas en el tratamiento con agua respecto a los de materia orgánica alta (Figura 24).



**Figura 24.** Raíces de maíz al terminar el experimento de los tratamientos A inóculo I (izquierda), 4.5–60% inóculo I (centro), 3.5–60% inóculo I (derecha).

Al igual que en la medición de altura de la planta, la inoculación de un consorcio nativo de HMA de un sitio previamente regado con vinazas ayudó en el crecimiento o disminuyó el efecto inhibitorio en el crecimiento de las plantas regadas con vinazas en los tratamientos más severos (pH bajo, MO alta o la combinación de los dos). De acuerdo con Sylvia y Williams (1992), la especie predominante en el inóculo N, *C. etunicatum*, beneficia a plantas de maíz bajo estrés hídrico, que se relaciona con estrés salino. Estos autores encontraron que la biomasa de las plantas inoculadas fue mayor a las no inoculadas bajo el mismo régimen de estrés hídrico.



#### 5.4.4 Análisis de varianza

El resultado del análisis de varianza (ANOVA) de los factores analizados y parámetros medidos se muestran en la Tabla 13. Análisis de Varianza para todos los factores (Error Tipo III).;Error! No se encuentra el origen de la referencia. El tratamiento tuvo un efecto significativo en todos los parámetros medidos, por lo que, sin entrar en detalles, la aplicación de vinazas sí ocasiona una perturbación que afecta no solo a las características fisicoquímicas del suelo, si no a los HMA que viven en él y, en consecuencia, a las plantas de maíz. El inóculo, el tiempo y las interacciones dobles y triples, también tuvieron un efecto significativo para algunos parámetros.

**Tabla 13.** Análisis de Varianza para todos los factores (Error Tipo III).

Factores e interacciones	P-value									
	pH	CE	PO4	FT	R	D	DE	%C	H	BT
Tratamiento	<i>0.0000</i>	<i>0.0000</i>	0.0986	<i>0.0000</i>	0.2190	0.1262	<i>0.0025</i>	<i>0.0002</i>	<i>0.0405</i>	<i>0.0016</i>
Inóculo	0.0745	0.3794	0.7008	<i>0.0375</i>	-	-	0.7264	0.0532	<i>0.0033</i>	<i>0.0000</i>
Tiempo	<i>0.0000</i>	<i>0.0308</i>	0.7365	<i>0.0000</i>	-	-	0.949	-	-	-
Tratamiento x Inóculo	<i>0.0358</i>	0.1427	<i>0.0001</i>	0.0867	-	-	<i>0.0001</i>	0.4940	0.1313	0.2104
Tratamiento x Tiempo	<i>0.0000</i>	<i>0.0000</i>	0.0687	<i>0.0000</i>	-	-	<i>0.0192</i>	-	-	-
Inóculo x Tiempo	0.2602	0.9784	0.1477	0.5865	-	-	0.5438	-	-	-
Tratamiento x Inóculo x Tiempo	<i>0.0314</i>	<i>0.7759</i>	0.0441	0.8914	-	-	0.1839	-	-	-

CE conductividad eléctrica, PO4 concentración de fósforo disponible, FT concentración de fenoles totales, DE densidad de esporas, R riqueza de especies, D diversidad de especies, %C porcentaje de colonización, H altura de planta, BT biomasa total de planta. Cursivas indican un efecto significativo (p-value<0.05)

## 5.4.5 Análisis multivariado

### 5.4.5.1 Correlaciones de Pearson

En la Tabla 14 se muestra el resultado del análisis de correlaciones de Pearson realizado para todos los parámetros estudiados; se puede observar que existe una correlación lineal fuerte (significativa) entre los parámetros del suelo pH, CE y FT. Las tres correlaciones son positivas. Anteriormente se observó que el pH del medio tiene una influencia en la degradación de compuestos fenólicos y en la absorción de iones disueltos por la planta y que los iones pueden influir en un aumento de pH en el suelo. Además, la concentración de compuestos fenólicos y de sales en el suelo se relaciona ya que ambos dependen de la concentración de vinaza que se regó.

Por otro lado, existen correlaciones significativas débiles. Los parámetros de desarrollo de los HMA y la planta están afectados por una combinación de los factores estudiados, por lo tanto, no existe una correlación lineal fuerte con alguno de estos parámetros del suelo.

El pH y la CE se correlacionan negativamente con la densidad de esporas (DE), lo que comprueba un efecto negativo del cambio de pH y de acumulación de sales en los HMA. Mientras tanto, el pH se correlacionó positivamente con la colonización, lo que indica que a medida que se alcalinizó el suelo se redujo la esporulación, pero aumentó la colonización.

**Tabla 14.** Correlaciones de Pearson (r) para todos los parámetros estudiados.

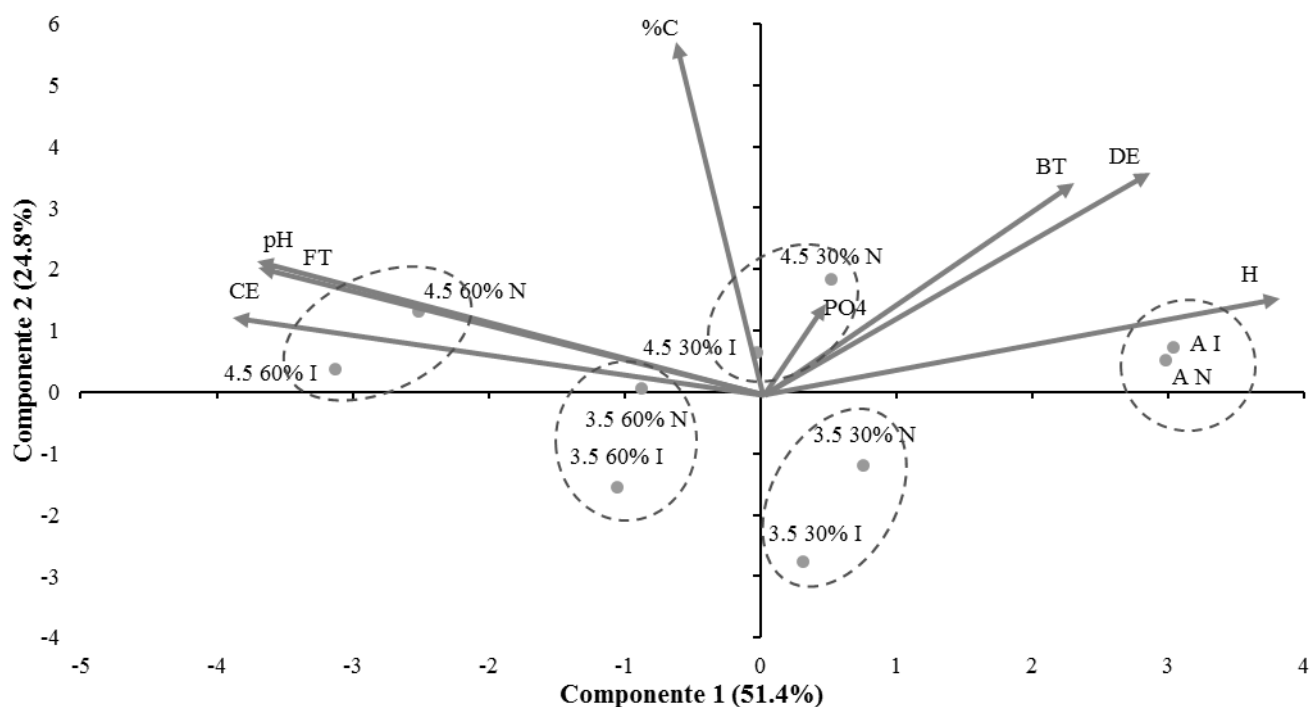
Variables	pH	CE	PO4	FT	R	D	DE	% C	H
<b>CE</b>	0.8085*								
<b>PO4</b>	0.1637	0.0211							
<b>FT</b>	0.8086*	0.7818*	0.0286						
<b>R</b>	0.3018	0.4220	0.2917	0.3834					
<b>D</b>	0.4809	0.5527	0.3672	0.5633*	0.6502*				
<b>DE</b>	-0.2877*	-0.3544*	0.1172	-0.2291	0.3130	-0.0397			
<b>% C</b>	0.3836*	0.2481	0.0985	0.3652*	0.7267	0.1341	0.3677*		
<b>H</b>	-0.2973*	-0.3904*	0.0480	-0.3039*	-0.5282	-0.1004	0.1407	0.1686	
<b>BT</b>	-0.2029	-0.2561	0.1531	-0.2546	0.0357	0.3275	0.3367*	0.5595*	0.4265*

CE conductividad eléctrica, PO4 concentración de fósforo disponible, FT concentración de fenoles totales, R riqueza de especies, D diversidad de especies, DE densidad de esporas, %C porcentaje de colonización, H altura de planta. \* Indica una correlación significativa (p-value<0.05).

La altura de maíz se correlacionó negativamente con el pH, CE y FT, por lo que se comprueba que el efecto de las vinazas sobre el crecimiento de maíz es negativo y se puede atribuir a estos parámetros del suelo, por lo menos parcialmente. Por último, la biomasa de la planta se correlacionó positivamente con la DE y %C ya que la colonización por HMA mejora su crecimiento.

#### 5.4.5.2 Análisis de componentes principales

El ACP de los parámetros estudiados en el tiempo 3 se muestra en la Figura 25. El componente 1 y 2 explican el 76.2% de la variabilidad de los datos. Se puede observar que los tratamientos se agrupan por tratamiento de aplicación de vinaza, mientras que el inóculo utilizado no representa una diferencia muy clara.



**Figura 25.** Análisis de componentes principales. CE conductividad eléctrica, PO4 concentración de fósforo disponible, FT concentración de fenoles totales, DE densidad de esporas, %C porcentaje de colonización, H altura de planta, BT biomasa total.

En el componente 1 se observa que la BT, DE y H se correlacionan negativamente con todos los parámetros del suelo, lo que indica que estos tres parámetros se vieron afectados negativamente por el aumento del pH, CE y FT en el suelo. Asimismo, los tratamientos 4.5–60% de ambos inóculos (N e I) fue en donde existieron mayores pH, CE y FT en el suelo y éstos se agrupan del lado contrario que los tratamientos con agua. De acuerdo con el componente 1 se puede apreciar que la aplicación de vinazas en estas condiciones de mayor concentración y alcalinización fue tratamiento más desfavorable en cuanto a la propagación de HMA y crecimiento de la planta. Los tratamientos 3.5–30%, 3.5–60% y 4.5–30% no tuvieron un efecto tan marcado que fuera contrario a su desarrollo.

Por otra parte, en el componente 2 se separa el porcentaje de colonización, mientras que en el lado negativo no se observa ningún parámetro al que se le pueda atribuir una mayor o menor colonización. Solamente se observa que el tratamiento 3.5–30% es para el que la colonización fue menor, así como la BT y DE aunque de una manera menos significativa.

## 6 Conclusiones

Los hongos micorrízicos arbusculares que se encuentran en un suelo donde se han aplicado vinazas tequileras frecuentemente, fueron más resistentes que un inóculo comercial a condiciones de perturbación como son la acidez y elevada concentración de materia orgánica de las vinazas, las cuales ocasionaron un aumento de pH, conductividad eléctrica y concentración de fenoles totales en el suelo.

La concentración de sales y los compuestos fenólicos en las vinazas son tóxicas para la germinación de semillas, disminuyen la germinación y crecimiento de la radícula de maíz desde una concentración de 25% de vinazas. Además, el riego de vinazas tequileras induce cambios en las propiedades del suelo que regulan la descomposición de la materia orgánica (aumento de pH) y adición de sales (aumento de CE). También se promueve una acumulación de compuestos fenólicos en el suelo correlacionada positivamente con el aumento del pH, aunque es posible que procesos de remoción de fenoles se lleven a cabo en el suelo, por las levaduras adicionadas y en presencia de plantas.

La densidad de esporas y colonización de HMA en el inóculo nativo no se vieron afectados negativamente por la aplicación de vinaza. Este inóculo nativo contuvo en mayor abundancia relativa a *C. etunicatum* y *F. geosporum.*, lo cual demostró su resistencia y posible adaptación a las condiciones que el riego con vinaza induce en el suelo.

Esto sugiere que para las condiciones y cambios que generan las vinazas en el suelo, especies nativas adaptadas a esas condiciones son más resistentes y podrían ayudar a las plantas en su crecimiento cuando son irrigadas con vinazas tequileras.



## 7 Recomendaciones

La aplicación de vinazas tequileras al suelo es una actividad que se debe realizar tomando en cuenta los factores de riesgo como las sales y compuestos fenólicos. Estos factores podrían afectar la presencia o desarrollo de HMA y por consiguiente, el desarrollo de las plantas. El riego de vinazas se debe realizar a bajas concentraciones y monitoreando periódicamente el lugar. Además, el uso de un consorcio nativo de HMA podría mejorar la resistencia de la planta a estas condiciones.

Se requieren estudios a largo plazo en condiciones de campo para verificar cuales fenómenos son los que prevalecen y podrían ser más dañinos para el ambiente después del riego continuo de vinazas tequileras y para verificar el funcionamiento del inóculo nativo en otras condiciones y temporadas del año.

Por último, existen otros factores en el suelo que probablemente cambiaron durante la aplicación de vinazas que deberían ser investigados también tales como la compactación del suelo que puede afectar la oxigenación, además de la acumulación de otros compuestos que pueden ser tóxicos como furfurales o melanoidinas, también presentes en las vinazas de tequila.





## 8 Bibliografía

- Adav, S.S., Chen, M.-Y., Lee, D.-J., Ren, N.-Q., 2006. Degradation of phenol by aerobic granules and isolated yeast *Candida tropicalis*. *Biotechnology and Bioengineering* 96, 844–852.
- Ale, R., Jha, P.K., Belbase, N., 2008. Effect of Distillery Effluent on Some Agricultural Crops, A Case of Environmental Injustice to Local Farmers in Khajura VDC, Banke. *Scientific World* 6, 68–75.
- Alloush, G. a., Zeto, S.K., Clark, R.B., 2000. Phosphorus source, organic matter, and arbuscular mycorrhiza effects on growth and mineral acquisition of chickpea grown in acidic soil. *Journal of Plant Nutrition* 23, 1351–1369.
- Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E.A., Hernández-Vargas, V., Ortega-Chávez, M., Orea-Lara, G., de León, A.C.D., Ávila-Reyes, J.A., Muñoz-Martínez, R., 2009. Profiling of phenolic compounds of somatic and reproductive tissues of *Agave durangensis* Gentry (*Agavaceae*). *American Journal of Applied Sciences* 6, 1076–1085.
- Almodares, A., Hadi, M.R., Dosti, B., 2007. Effects of salt stress on germination percentage and seedling growth in sweet sorghum cultivars. *Journal of Biological Sciences* 7, 1492–1495.
- Álvarez-Sánchez, J., Monroy, A., 2008. Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración, Las prensas de Ciencias UNAM, México.
- Alves, P.R.L., Natal-da-Luz, T., Sousa, J.P., Cardoso, E.J.B.N., 2015. Ecotoxicological characterization of sugarcane vinasses when applied to tropical soils. *Science of the Total Environment* 526, 222–232.
- American Public Health Association, 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater, 18th ed. Washington, D.C.
- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 1999. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. American Public Health Association American Water Works Association Water Environment Federation, Washington, D.C.
- Avio, L., Giovannetti, M., 1988. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of lucerne roots in a cellulose-amended soil. *Plant and soil* 112, 99–104.
- Ayers, R.S., Westcot, D.W., 1976. Water quality for agriculture. FAO, Roma.
- Báidez, A.G., Gómez, P., Del Río, J.A., Ortuño, A., 2006. Antifungal capacity of major phenolic compounds of *Olea europaea* L. against *Phytophthora megasperma* Drechsler and *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69, 224–229.
- Bécard, G., Doude, D.D., Pfeffer, P.E., 1992. Extensive *in vitro* hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO<sub>2</sub> and flavonols. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 821–825.

- Bécard, G., Taylor, L.P., Douds, D.D., Pfeffer, P.E., Doner, L.W., 1995. Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8, 252–258.
- Bending, G.D., Read, D.J., 1997. Lignin and soluble phenolic degradation by ectomycorrhizal and ericoid mycorrhizal fungi. *Mycological Research* 101, 1348–1354.
- Bergmark, C.L., Jackson, W.A., Volk, R.J., Blum, U., 1992. Differential inhibition by ferulic acid of nitrate and ammonium uptake in *Zea mays* L. *Plant Physiology* 98, 639–645.
- Bessho, T., Bell, L.C., 1992. Soil solid and solution phase changes and mung bean response during amelioration of aluminium toxicity with organic matter. *Plant and Soil* 140, 183–196.
- Bever, J.D., Schultz, P. a., Pringle, A., Morton, J.B., 2001. Arbuscular Mycorrhizal Fungi: More Diverse than Meets the Eye, and the Ecological Tale of Why. *BioScience* 51, 923.
- Bilalis, D.J., Karamanos, A.J., 2010. Organic maize growth and mycorrhizal root colonization response to tillage and organic fertilization. *Journal of Sustainable Agriculture* 34, 836–849.
- Blum, U., Dalton, B.R., Shann, J.R., 1985. Effects of ferulic and p-coumaric acids in nutrient culture of cucumber leaf expansion as influenced by pH. *Journal of Chemical Ecology* 11.
- Bonfante, P., Anca, I.-A., 2009. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual Review of Microbiology* 63, 363–383.
- Bonfante, P., Desiró, A., 2015. Arbuscular mycorrhizas: The lives of beneficial fungi and their plant hosts, en: Lugtenberg, B. (Ed.), *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture*. Springer International Publishing Switzerland, pp. 1–448.
- Boufalis, A., Pellissier, F., 1994. Allelopathic effects of phenolic mixtures on respiration of two spruce mycorrhizal fungi. *Journal of Chemical Ecology* 20, 2283–2289.
- Box, J.D., 1983. Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Research* 17, 511–525.
- Brown, K., Wherret, A., 2017. Bulk Density – Measurement. *Healthy Soils for Sustainable Farms*. URL <http://soilquality.org.au/factsheets/bulk-density-measurement> (consultado 1.14.17).
- Brundrett, M.C., Melville, L., Peterson, L. (Eds.), 1994. *Practical Methods in Mycorrhizal Research*. Mycologue, Sydney, B.C., Canada.
- Bucher, M., 2007. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist* 173, 11–26.
- Buitrón, G., Carvajal, C., 2010. Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresource Technology* 101, 9071–9077.
- Cakir, R., 2004. Effect of water stress at different development stages on vegetative and reproductive growth of corn. *Field Crops Research* 89, 1–16.
- Campagnac, E., Khasa, D.P., 2014. Relationship between genetic variability in

- Rhizophagus irregularis* and tolerance to saline conditions. *Mycorrhiza* 24, 121–129.
- Canellas, L.P., Velloso, a. C.X., Marciano, C.R., Ramalho, J.F.G.P., Rumjanek, V.M., Rezende, C.E., Santos, G. a., 2003. Propriedades químicas de um Cambissolo cultivado com cana-de-açúcar, com preservação do palhico e adição de vinhaça por longo tempo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 27, 935–944.
- Carpıcı, E.B., Celik, N., Bayram, G., 2009. Effects of salt stress on germination of some maize (*Zea mays* L.) cultivars. *Journal of Biotechnology* 8, 4918–4922.
- Cavagnaro, T.R., 2014. Impacts of compost application on the formation and functioning of arbuscular mycorrhizas. *Soil Biology and Biochemistry* 78, 38–44.
- Cedeño, M., 1995. Tequila production. *Critical Reviews in Biotechnology* 15, 1–11.
- Celebi, S.Z., Demir, S., Celebi, R., Durak, E.D., Yilmaz, I.H., 2010. The effect of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) applications on the silage maize (*Zea mays* L.) yield in different irrigation regimes. *European Journal of Soil Biology* 46, 302–305.
- CETESB, 2006. Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola., Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.
- Chandra, R., Bharagava, R.N., Rai, V., 2008. Melanoidins as major colourant in sugarcane molasses based distillery effluent and its degradation. *Bioresource Technology* 99, 4648–4660.
- Christofolletti, C.A., Escher, J.P., Correia, J.E., Marinho, J.F.U., Fontanetti, C.S., 2013. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Management* 33, 2752–2761.
- Clark, R.B., 1997. Arbuscular mycorrhizal adaptation, spore germination, root colonization, and host plant growth and mineral acquisition at low pH. *Plant and Soil* 192, 15–22.
- Consejo Regulador del Tequila, 2016a. Consumo de agave para Tequila y Tequila 100% de agave. URL <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/> (consultado 1.16.17).
- Consejo Regulador del Tequila, 2016b. Producción Total: Tequila y Tequila 100%. URL <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/> (consultado 1.16.17).
- Corkidi, L., Evans, M., Bohn, J., 2008. An introduction to propagation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in pot cultures for inoculation of native plant nursery stock. *Native Plants Journal* 9, 29–38.
- Da Silva, M.A.S., Griebeler, N.P., Borges, L.C., 2007. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 11, 108–114.
- De Azevedo, L.C.B., Stürmer, S.L., Lambais, M.R., 2014. Early changes in arbuscular mycorrhiza development in sugarcane under two harvest management systems. *Brazilian Journal of Microbiology* 45, 995–1005.
- De Oliveira, B.G., Carvalho, J.L.N., Cerri, C.E.P., Cerri, C.C., Feigl, B.J., 2013. Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas. *Geoderma* 200–201, 77–84.
- De Souza, F.A., Dalpé, Y., Declerck, S., De la Providencia, I.E., Séjalon-Delmas, N., 2005. Life History Strategies in Gigasporaceae: Insight from Monoxenic Culture, en: Declerck, S., Fortin, J.A., Strullu, D.-G. (Eds.), *In Vitro Culture of Mycorrhizas*, Soil Biology. Springer Berlin Heidelberg, pp. 73–91.

- Del Val, C., Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C., 1999. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 718–723.
- Demattê, J.A.M., Gama, M.A.P., Cooper, M., Araújo, J.C., Nanni, M.R., Fiorio, P.R., 2004. Effect of fermentation residue on the spectral reflectance properties of soils. *Geoderma* 120, 187–200.
- Devi, S.R., Prasad, M.N. V, 1992. Effect of ferulic acid on growth and hydrolytic enzyme activities of germinating maize seeds. *Journal of Chemical Ecology* 18, 1981–1990.
- Doke, K.M., Khan, E.M., Rapolu, J., Shaikh, A., 2011. Physico-Chemical Analysis of Sugar Industry Effluent and Its Effect on Seed Germination of *Vigna Angularis*, *Vigna Cylindrica*. *Annals of Environmental Science* 5, 7–11.
- Dwivedi, U.N., Singh, P., Pandey, V.P., Kumar, A., 2011. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 68, 117–128.
- España-Gamboa, E., Mijangos-Cortes, J., Barahona-Perez, L., Dominguez-Maldonado, J., Hernández-Zarate, G., Alzate-Gaviria, L., 2011. Vinasses: characterization and treatments. *Waste management & research: the journal of the International Solid Wastes and Public Cleansing Association, ISWA* 29, 1235–50.
- Estrada, B., Aroca, R., Maathuis, F.J.M., Barea, J.M., Ruiz-Lozano, J.M., 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi native from a Mediterranean saline area enhance maize tolerance to salinity through improved ion homeostasis. *Plant, Cell and Environment* 36, 1771–1782.
- Evelin, H., Giri, B., Kapoor, R., 2012. Contribution of *Glomus intraradices* inoculation to nutrient acquisition and mitigation of ionic imbalance in NaCl-stressed *Trigonella foenum-graecum*. *Mycorrhiza* 22, 203–217.
- Evelin, H., Kapoor, R., Giri, B., 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: A review. *Annals of Botany* 104, 1263–80.
- Floch, C., Alarcon-Gutiérrez, E., Criquet, S., 2007. ABTS assay of phenol oxidase activity in soil. *Journal of Microbiological Methods* 71, 319–324.
- Food and Agriculture Organization, 2001. Lecture Notes on the Major Soils of the World. URL <http://www.fao.org/docrep/003/y1899e/y1899e11.htm> (consultado 3.10.15).
- Food and Agriculture Organization (FAO), 1985. FAO Irrigation and drainage paper 29, Rev. 1. URL <http://www.fao.org/docrep/003/t0234e/t0234e00.htm>
- Fries, L.L.M., Pacovsky, R.S., Safir, G.R., Siqueira, J.O., 1997. Plant growth and arbuscular mycorrhizal fungal colonization affected by exogenously applied phenolic compounds. *Journal of Chemical Ecology* 23, 1755–1767.
- Fuess, L.T., Garcia, M.L., 2014. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. *Journal of Environmental Management* 145, 210–229.
- Gallardo-Valdez, J., 2015. Industria tequilera, visión y tecnología de su desarrollo, en: Gschaedler Mathis, A.C., Rodriguez Garay, B., Prado Ramírez, R., Flores Montaña, J.L. (Eds.), *Ciencia y tecnología del tequila: Avances y perspectivas*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., pp. 1–15.
- Gaur, A., Adholeya, A., 2002. Arbuscular-mycorrhizal inoculation of five tropical fodder

- crops and inoculum production in marginal soil amended with organic matter. *Biology and Fertility of Soils* 35, 214–218.
- Gerdemann, J.W., 1964. The effect of mycorrhiza on the growth of maize. *Mycologia* 56, 342–349.
- González, J.A., Languasco, P., Prado, F.E., 2014. Efecto de las Vinazas sobre la Germinación de Soja, Trigo y Quinoa en Condiciones Controladas. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 49, 473–481.
- Green, N.E., Graham, S.O., Schenck, N.C., 1976. The influence of pH on the germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal spores. *Mycological Society of America* 68, 929–934.
- Gryndler, M., Hršelová, H., Cajthaml, T., Havránková, M., Řezáčová, V., Gryndlerová, H., Larsen, J., 2009. Influence of soil organic matter decomposition on arbuscular mycorrhizal fungi in terms of asymbiotic hyphal growth and root colonization. *Mycorrhiza* 19, 255–266.
- Gryndler, M., Larsen, J., Hršelová, H., Řezáčová, V., Gryndlerová, H., Kubát, J., 2006. Organic and mineral fertilization, respectively, increase and decrease the development of external mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in a long-term field experiment. *Mycorrhiza* 16, 159–166.
- Gschaedler, A., Pinal, L., Rodríguez, I., Pinal, L., Arellano, M., Herrera, E., Téllez, P., 2000. Estudio de la generación de compuestos organolépticos durante las etapas de cocimiento y fermentación del proceso de producción de tequila. Informe técnico, Proyecto SIMORELOS.
- Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Bagci, E.G., Cicek, N., 2007. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal of Plant Physiology* 164, 728–736.
- Hati, K.M., Biswas, A.K., Bandyopadhyay, K.K., Misra, A.K., 2007. Soil properties and crop yields on a vertisol in India with application of distillery effluent. *Soil and Tillage Research* 92, 60–68.
- Henkel, T.W., Smith, W.K., Christensen, M., 1989. Infectivity and effectivity of indigenous vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi from contiguous soils in southwestern Wyoming, USA. *New Phytologist* 112, 205–214.
- Hodge, A., Storer, K., 2015. Arbuscular mycorrhiza and nitrogen: implications for individual plants through to ecosystems. *Plant and Soil* 386, 1–19.
- Hofmann, K.H., Schauer, F., 1988. Utilization of phenol by hydrocarbon assimilating yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 54, 179–188.
- Ijdo, M., Cranenbrouck, S., Declerck, S., 2011. Methods for large-scale production of AM fungi: Past, present, and future. *Mycorrhiza* 21, 1–16.
- INEGI, 2010. Mapa Digital de México V6.1. URL <http://gaia.inegi.org.mx/mdm6/> (consultado 7.10.15).
- Íñiguez-Covarrubias, G., Peraza-Luna, F., 2007. Reduction of solids and organic load concentrations in tequila vinasses using a polyacrylamide (PAM) polymer flocculant. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 23, 17–24.
- Íñiguez, G., Acosta, N., Martínez, L., Parra, J., González, O., 2005. Utilización de

- subproductos de la industria tequilera. Parte 7. Compostaje de bagazo de agave y vinazas tequileras. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 21, 37–50.
- Jansa, J., Wiemken, A., Frossard, E., 2006. The effects of agricultural practices on arbuscular mycorrhizal fungi. *Geological Society London Special Publications* 266, 89–115.
- Jiang, Z.P., Li, Y.R., Wei, G.P., Liao, Q., Su, T.M., Meng, Y.C., Zhang, H.Y., Lu, C.Y., 2012. Effect of long-term vinasse application on physico-chemical properties of sugarcane field soils. *Sugar Tech* 14, 412–417.
- John, J., Sarada, S., 2012. Role of phenolics in allelopathic interactions. *Allelopathy Journal* 29, 215–229.
- Kernaghan, G., 2005. Mycorrhizal diversity: Cause and effect? *Pedobiologia* 49, 511–520.
- Koide, R.T., Kabir, Z., 2000. Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. *New Phytologist* 511–517.
- Koide, R.T., Mosse, B., 2004. A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza* 14, 145–163.
- Lachance, M.A., 1995. Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* 68, 151–160.
- Laconi, S., Molle, G., Cabiddu, A., Pompei, R., 2007. Bioremediation of olive oil mill wastewater and production of microbial biomass. *Biodegradation* 18, 559–566.
- Laime, E.M., 2011. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça. *Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas* 5.
- Lambert, D.H., Jr., H.C., Baker, D.E., 1980. Adaptation of vesicular-arbuscular mycorrhizae to edaphic factors. *New Phytologist* 85, 513–520.
- Lenoir, I., Fontaine, J., Lounès-Hadj Sahraoui, A., 2016. Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: A review. *Phytochemistry* 123, 4–15.
- Li, H.-H., Inoue, M., Nishimura, H., Mizutani, J., Tsuzuki, E., 1993. Interactions of trans-cinnamic acid, its related phenolic allelochemicals, and abscisic acid in seedling growth and seed germination of lettuce. *Journal of Chemical Ecology* 19, 1775–1787.
- Li, T., Lin, G., Zhang, X., Chen, Y., Zhang, S., Chen, B., 2014. Relative importance of an arbuscular mycorrhizal fungus (*Rhizophagus intraradices*) and root hairs in plant drought tolerance. *Mycorrhiza* 24, 595–602.
- Li, Z.H., Wang, Q., Ruan, X., Pan, C. De, Jiang, D.A., 2010. Phenolics and plant allelopathy. *Molecules* 15, 8933–8952.
- López-López, A., Contreras-Ramos, S.M., 2015. Tratamiento de efluentes y aprovechamiento de residuos, en: Gschaedler Mathis, A.C., Rodríguez Garay, B., Prado Ramírez, R., Flores Montaña, J.L. (Eds.), *Ciencia y tecnología del tequila: Avances y perspectivas*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Guadalajara, pp. 343–378.
- López-López, A., Davila-Vazquez, G., León-Becerril, E., Villegas-García, E., Gallardo-Valdez, J., 2010. Tequila vinasses: Generation and full scale treatment processes. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 9, 109–116.
- Lyu, S.-W., Blum, U., Gerig, T.M., O'Brien, T.E., 1990. Effects of mixtures of phenolic acids on phosphorus uptake by cucumber seedlings. *Journal of Chemical Ecology* 16,

2559–2567.

- Madejón, E., López, R., Murillo, J.M., Cabrera, F., 2001. Agricultural use of three (sugar-beet) vinasse composts: Effect on crops and chemical properties of a Cambisol soil in the Guadalquivir river valley (SW Spain). *Agriculture, Ecosystems and Environment* 84, 55–65.
- Magurran, A.E., 2004. An index of diversity, en: *Measuring biological diversity*. Blackwell Publishing, Padstow, United Kingdom.
- Mancilla-Margalli, N.A., López, M.G., 2016. Generation of maillard compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 806–812.
- Manibhushanrao, U.I.B.K., 1996. Influence of organic amendments on arbuscular mycorrhizal fungi in relation to rice sheath blight disease. *Mycorrhiza* 6, 201–206.
- Marino-Marmolejo, E.N., Corbalá-Robles, L., Cortez-Aguilar, R.C., Contreras-Ramos, S.M., Bolaños-Rosales, R.E., Davila-Vazquez, G., 2015. Tequila vinasses acidogenesis in a UASB reactor with *Clostridium* predominance. *SpringerPlus* 4, 419.
- Marleau, J., Dalpé, Y., St-Arnaud, M., Hijri, M., 2011. Spore development and nuclear inheritance in arbuscular mycorrhizal fungi. *BMC Evolutionary Biology* 11, 51.
- Marschner, B., Noble, A.D., 2000. Chemical and biological processes leading to the neutralisation of acidity in soil incubated with litter materials. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 805–813.
- Mathimaran, N., Ruh, R., Vullioud, P., Frossard, E., Jansa, J., 2005. *Glomus intraradices* dominates arbuscular mycorrhizal communities in a heavy textured agricultural soil. *Mycorrhiza* 16, 61–66.
- Mattigod, S.V., Zachara, J.M., 1996. *Chemical Methods, Methods of Soil Analysis*. Soil Science Society of America, Wisconsin, USA.
- McGonigle, T.P., Miller, M.H., Evans, D.G., Fairchild, G.L., Swan, J. a., 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115, 495–501.
- Medeiros, C.A., Clark, R.B., Ellis, J.R., 1994. Growth and nutrient uptake of sorghum cultivated with vesicular–arbuscular mycorrhiza isolates at varying pH. *Mycorrhiza* 4, 185–191.
- Miller, R.M., Jastrow, J.D., Reinhardt, D.R., 1995. External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. *Oecologia* 103, 17–23.
- Mokolobate, M.S., Haynes, R.J., 2002. Comparative liming effect of four organic residues applied to an acid soil. *Biology and Fertility of Soils* 35, 79–85.
- Montenegro-Gomez, S.P., 2008. Influencia de la aplicación de vinaza sobre la presencia, actividad y biomasa microbiana del suelo en el cultivo de maíz dulce (*Zea mays*). Universidad Nacional de Colombia.
- Moran-Salazar, R.G., 2015. Efecto de la aplicación de vinazas tequileras sobre los procesos de nitrificación, desnitrificación y emisiones de gases con efecto invernadero en suelos agrícolas. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C.
- Moran-Salazar, R.G., Sanchez-Lizarraga, A.L., Rodriguez-Campos, J., Davila-Vazquez, G.,

- Marino-Marmolejo, E.N., Dendooven, L., Contreras-Ramos, S.M., 2016. Utilization of vinasses as soil amendment: Consequences and perspectives. SpringerPlus 5.
- Muscolo, A., Sidari, M., da Silva, J. a T., 2013. Biological effects of water-soluble soil phenol and soil humic extracts on plant systems. *Acta Physiologiae Plantarum* 35, 309–320.
- Na Bhadalung, N., Suwanarit, A., Dell, B., Nopamornbodi, O., Thamchaipenet, A., Rungchuang, J., 2005. Effects of long-term NP-fertilization on abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi under a maize cropping system. *Plant and Soil* 270, 371–382.
- Nadian, H., Smith, S.E., Alston, a M., Murray, R.S., Siebert, B.D., Osmond, G., 1998. Effects of soil compaction on phosphorus uptake and growth of *Trifolium subterraneum* colonized by four species of vesicular – arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 140, 155–165.
- Nakatani, A.S., Mescolotti, D.L.C., Nogueira, M. a., Martines, A.M., Miyauchi, M.Y.H., Stürmer, S.L., Cardoso, E.J.B.N., 2011. Dosage-dependent shift in the spore community of arbuscular mycorrhizal fungi following application of tannery sludge. *Mycorrhiza* 21, 515–522.
- Nasim, G., 2012. Arbuscular mycorrhizae for sustainable agriculture, en: Ashraf, M., Öztürk, M., Aqeel Ahmad, M.S., Aksoy, A. (Eds.), *Crop Production for Agricultural Improvement*. Springer, p. 786.
- Newsham, K.K., Fitter, A.H., Watkinson, A.R., 1995. Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Ecology & Evolution* 10, 407–411.
- NMX-AA-132-SCFI-2006, 2006. Muestreo de suelos para la identificación y la cuantificación de metales y metaloides, y manejo de la muestra. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación 05/09/2006, México.
- NMX-FF-109-SCFI-2007, 2007. Humus de lombriz (lombricomposta): Especificaciones y métodos de prueba. Dirección de Normalización. Diario Oficial de la Federación 10/06/2008, México.
- NOM-001-SEMARNAT-1996, 1996. Norma Oficial Mexicana que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación 24/06/1996, México.
- NOM-002-SEMARNAT-1996, 1996. Norma Oficial Mexicana que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación 03/06/1998.
- NOM-006-SCFI-2012, 2012. Norma Oficial Mexicana, Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación 13/12/2012, México.
- NOM-021-SEMARNAT-2000, 2000. Norma Oficial Mexicana que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación 31/12/2002, México.
- NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, 2004. Norma Oficial Mexicana que establece



criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación 02/03/2007, México.

- Oksinska, M.P., Pietr, S.J., Wright, S.A.I., 2013. Resistance to oxidation products of caffeic acid is important for efficient colonization of wheat seedlings by *Pseudomonas proteolytica* strain PSR114. *Applied Soil Ecology* 66, 71–80.
- Oliveira, R.S., Vosátka, M., Dodd, J.C., Castro, P.M.L., 2005. Studies on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and the efficacy of two native isolates in a highly alkaline anthropogenic sediment. *Mycorrhiza* 16, 23–31.
- Olsen, S.R., Cole, C. V., Watanabe, F.S., Dean, L.A., 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate.
- Pandey, S.N., Nautiyal, B.D., Sharma, C.P., 2008. Pollution level in distillery effluent and its phytotoxic effect on seed germination and early growth of maize and rice. *Journal of Environmental Biology* 29, 267–270.
- Parnaudeau, V., Condom, N., Oliver, R., Cazeville, P., Recous, S., 2008. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. *Bioresource Technology* 99, 1553–1562.
- Parniske, M., 2008. Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* 6, 763–775.
- Patel, R., Rajkumar, S., 2009. Isolation and characterization of phenol degrading yeast. *Journal of Basic Microbiology* 49, 216–219.
- Pereira Aleixo, A., Kaschuk, G., Alberton, O., 2014. Soil fungal and bacterial biomass determined by epifluorescence microscopy and mycorrhizal spore density in different sugarcane managements. *Ciencia Rural* 44, 588–594.
- Pérez Martínez, F.J., Rodríguez González, E., Arellano Plaza, M., Camacho Ruiz, R.M., Prado Ramírez, R., 2015. Extracción del jugo de agave, en: Gschaedler Mathis, A.C., Rodríguez Garay, B., Prado Ramírez, R., Flores Montaña, J.L. (Eds.), *Ciencia y tecnología del tequila: Avances y perspectivas*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Guadalajara, pp. 55–95.
- Phillips, J.M., Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55, 158–160.
- Piernas, V., Guiraud, J.P., 1997. Disinfection of rice seeds prior to sprouting. *Journal of Food Science* 62, 611–615.
- Piotrowski, J.S., Morford, S.L., Rillig, M.C., 2008. Inhibition of colonization by a native arbuscular mycorrhizal fungal community via *Populus trichocarpa* litter, litter extract, and soluble phenolic compounds. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 709–717.
- Porter, A.W.M., Robson, a D., Abbott, L.K., 2013. Factors controlling the distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil pH. *British Ecological Society* 24, 663–672.
- Pozo, M.J., Azcón-Aguilar, C., 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 393–398.
- Prado Ramírez, R., 2015. Destilación, en: Gschaedler Mathis, A.C., Rodríguez Garay, B.,

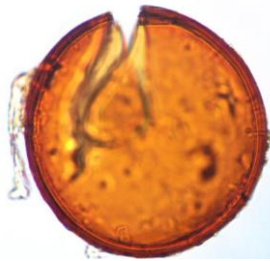
- Prado Ramírez, R., Flores Montaña, J.L. (Eds.), Ciencia y tecnología del tequila: Avances y perspectivas. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Guadalajara, pp. 181–230.
- Pringle, A., Bever, J.D., Gardes, M., Parrent, J.L., Rillig, M.C., Klironomos, J.N., 2009. Mycorrhizal symbioses and plant invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40, 699–715.
- Quiñones- Aguilar, E.E., Rincón-Enríquez, G., Hernández-Cuevas, L.V., López-Pérez, L., 2015. Influence of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Concentrations on *Carica papaya* Plant Growth and Nitrogen. *International Journal of Agriculture & Biology* 17, 119–126.
- Ramana, S., Biswas, a. K., Kundu, S., Saha, J.K., Yadava, R.B.R., 2002. Effect of distillery effluent on seed germination in some vegetable crops. *Bioresource Technology* 82, 273–275.
- Ravnskov, S., Larsen, J., Olsson, P. a., Jakobsen, I., 1999. Effects of various organic compounds on growth and phosphorus uptake of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 141, 517–524.
- Redecker, D., Schüßler, A., Stockinger, H., Stürmer, S.L., Morton, J.B., Walker, C., 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza* 23, 515–531.
- Retes-Pruneda, J.L., Davila-Vazquez, G., Medina-Ramírez, I., Chavez-Vela, N.A., Lozano-Alvarez, J.A., Alatraste-Mondragon, F., Jauregui-Rincon, J., 2014. High removal of chemical and biochemical oxygen demand from tequila vinasses by using physicochemical and biological methods. *Environmental Technology* 35, 1773–1784.
- Rodríguez-Félix, E., Rodríguez-Campos, J., Cervantes-Martínez, J., Davila-Vazquez, G., 2016a. Datos no publicados.
- Rodríguez-Félix, E., Rodríguez-Campos, J., Cervantes-Martínez, J., Villanueva-Rodríguez, S., Davila-Vazquez, G., 2016b. Identification of volatile compounds found in Tequila vinasses.
- Rowe, D.R., Abdel-Magid, I.M., 1995. Handbook of wastewater reclamation and reuse. CRC Press.
- Rowe, H.I., Brown, C.S., Claassen, V.P., 2007. Comparisons of mycorrhizal responsiveness with field soil and commercial inoculum for six native montane species and *Bromus tectorum*. *Restoration Ecology* 15, 44–52.
- Sánchez-Lizárraga, A.L., 2015a. Variación de la población de hongos micorrízicos arbusculares en un suelo agrícola por efecto de la aplicación de vinazas de la industria del tequila. Tesis de maestría. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.
- Sánchez-Lizárraga, A.L., 2015b. Comunicación personal.
- Santos, M., Diáñez, F., de Cara, M., Tello, J.C., 2008. Possibilities of the use of vinasses in the control of fungi phytopathogens. *Bioresource Technology* 99, 9040–9043.
- Shannon, C.E., 2001. A mathematical theory of communication. *ACM SIGMOBILE Mobile Computing and Communications Review* 5, 3–55.
- Shreenivasa, K.R., Krishnappa, K., Rekha, D., 2011. Interaction effect of arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus fasciculatum* and root knot nematode *Meloidogyne*

- incognita on biochemical parameters in tomato. *International Journal of Science and Nature* 2, 534–537.
- SIAP-SAGARPA, 2013. Anuario estadístico de la producción agrícola. URL <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/> (consultado 4.23.15).
- Siddiqui, Z. a, Pichtel, J., 2008. Mycorrhizae: An overview, en: Siddiqui, Z.A. (Ed.), *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. pp. 1–35.
- Sieverding, E., Friedrichsen, J., Suden, W., 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Sonderpublikation der GTZ (Germany).
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *The American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144–158.
- Sinsabaugh, R.L., 2010. Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 391–404.
- Sistema de Información Arancelaria Vía Internet (SIAVI), 2016. Estadísticas anuales para tequila (22089003). Secretaría de Economía. URL <http://www.economia-snci.gob.mx/> (consultado 8.23.16).
- Sivakumar, N., 2013. Effect of edaphic factors and seasonal variation on spore density and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi in sugarcane fields. *Annals of Microbiology* 63, 151–160.
- Sonneveld, C., Van den Ende, J., 1971. Soil analysis by means of a 1:2 volume extract. *Plant and Soil* 35, 505–516.
- Soobadar, A., Ng Kee Kwong, K.F.R., 2012. Impact of High Rates of Vinasse on Some Pertinent Soil Characteristics and on Sugarcane Yield in Mauritius. *Journal of Sustainable Agriculture* 36, 36–53.
- Spellerberg, I.F., Fedor, P.J., 2003. A tribute to Claude-Shannon (1916-2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the “Shannon-Wiener” Index. *Global Ecology and Biogeography* 12, 177–179.
- Sylvia, D.M., Williams, S.E., 1992. Vesicular-Arbuscular mycorrhizae and environmental stress, en: *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Madison, USA, pp. 101–124.
- Tarbell, T.J., Koske, R.E., 2007. Evaluation of commercial arbuscular mycorrhizal inocula in a sand/peat medium. *Mycorrhiza* 18, 51–56.
- Tejada, M., Gonzalez, J.L., 2005. Beet vinasse applied to wheat under dryland conditions affects soil properties and yield. *European Journal of Agronomy* 23, 336–347.
- Tejada, M., Moreno, J.L., Hernandez, M.T., Garcia, C., 2007. Application of two beet vinasse forms in soil restoration: Effects on soil properties in an arid environment in southern Spain. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 119, 289–298.
- Tobe, K., Li, X., Omasa, K., 2002. Effects of sodium, magnesium and calcium salts on seed germination and radicle survival of a halophyte, *Kalidium caspicum* (Chenopodiaceae). *Australian Journal of Botany* 50, 163–169.
- United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service, National Soil Survey Center, Kellog Soil Survey Laboratory, 2014. Soil Survey Field

- and Laboratory Methods Manual Version 2.
- USEPA, 2004. Guidelines for Water Reuse. EPA/625/R-04/108. United States.
- Vadivel, R., Singh Minhas, P., Kumar P, S., Singh, Y., Rao D.V.K., N., Nirmale, A., 2014. Significance of vinasses waste management in agriculture and environmental quality-Review. African Journal of Agricultural Research 9, 2862–2873.
- Van Aarle, I.M., Olsson, P.A., Söderström, B., 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi respond to the substrate pH of their extraradical mycelium by altered growth and root colonization. New Phytologist 155, 173–182.
- Velasquez, D., Sanchez, M., 2011. Efecto de vinazas sobre hongos que forman micorriza arbuscular en un molisol del Valle del Cauca, Colombia. Revista de la Facultad de Agronomía 64, 5755–5767.
- Wacker, T.L., Safir, G.R., Stephens, C.T., 1990. Effects of ferulic acid on *Glomus fasciculatum* and associated effects on phosphorus uptake and growth of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). Journal of Chemical Ecology 16, 901–909.
- Wang, G.M., Stribley, D.P., Tinker, P.B., Walker, C., 1993. Effects of pH on arbuscular mycorrhiza I. Field observations on the long-term liming experiments at Rothamsted and Woburn. New Phytologist 124, 465–472.
- Wilde, P., Manal, A., Stodden, M., Sieverding, E., Hildebrandt, U., Bothe, H., 2009. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in roots and soils of two salt marshes. Environmental Microbiology 11, 1548–1561.
- Wright, S.F., Upadhyaya, A., 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. Plant and Soil 198, 97–107.
- Yan, F., Schubert, S., Mengel, K., 1996. Soil pH increase due to biological decarboxylation of organic anions. Soil Biology and Biochemistry 28, 617–624.

# Anexos

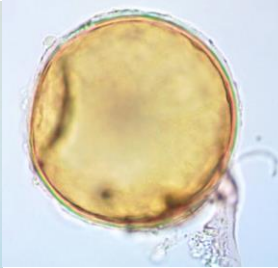
## A. Especies de HMA identificadas en t3



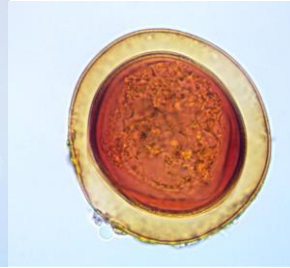
*Claroideoglossus etunicatum*



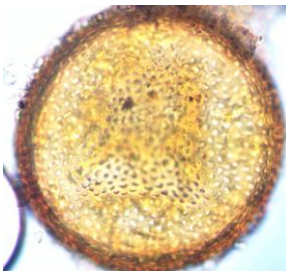
*Funneliformis geosporum*



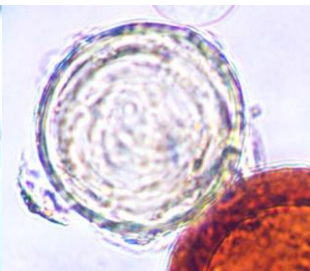
*Funneliformis mosseae*



*Acaulospora morrowiae*



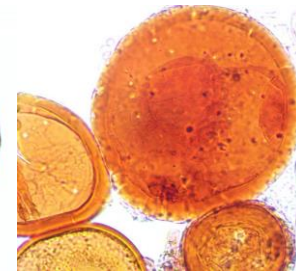
*Acaulospora scrobiculata*



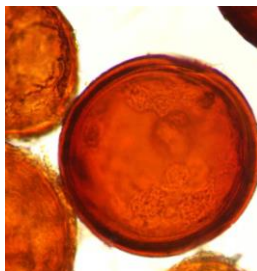
*Diversispora spurca*



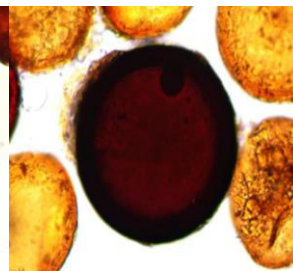
*Acaulospora mellea*



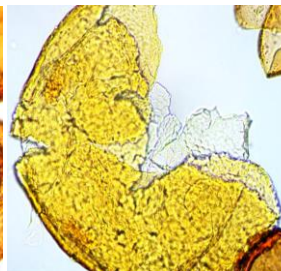
*Glomus macrocarpum*



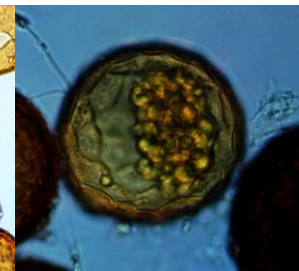
*Acaulospora laevis*



*Septoglossus constrictum*



*Ambispora appendicula*



*Ambispora aff. gerdemannii*