CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.

EFECTO DE LA APLICACIÓN DE VINAZAS DE LA INDUSTRIA DEL TEQUILA EN EL CULTIVO DEL MAÍZ Y EN LA ASOCIACIÓN PLANTA-HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (HMA)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN LA ESPECIALIDAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL

PRESENTA

IBAM. DIEGO ANTONIO TUESTA POPOLIZIO

GUADALAJARA, JAL.FEBRERO 2017.

CIENCIA Y TECNOLOGIA

Guadalajara, Jalisco a 20 de febrero de 2017

CONSEJO GENERAL DEL POSGRADO
INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del estudiante **Diego Antonio Tuesta Popolizio**, una vez leída y revisada la Tesis titulada "EFECTO DE LA APLICACIÓN DE VINAZAS DE LA INDUSTRIA DEL TEQUILA EN EL CULTIVO DEL MAÍZ Y EN LA ASOCIACIÓN PLNATA-HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (HMA)" aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el estudiante para aspirar al grado de Maestro en el Posgrado Interinstitucional en Ciencia y Tecnología con 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 2017.

Dr. Gustavo Dávila Vázquez
Tutor Académico

Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar
Tutor en planta

Dra. Silvia Maribel Contreras Ramos
Directo Académico

CIENCIA Y TECNOLOGIA

Guadalajara, Jalisco a 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 del estudiante **Diego Antonio Tuesta Popolizio**, una vez leída y revisada la Tesis titulada "EFECTO DE LA APLICACIÓN DE VINAZAS DE LA INDUSTRIA DEL TEQUILA EN EL CULTIVO DEL MAÍZ Y EN LA ASOCIACIÓN PLANTA-HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (HMA)" aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el estudiante para aspirar al grado de Maestro en el Posgrado Interinstitucional en Ciencia y Tecnología con 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 2017.

Dra. Dioselina Álvarez Bernal
Presidente

M.C. Laura Hernández Cuevas
Secretaria

Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar
Vocal

DEDICATORIA

A mis padres Luis y Mariana, por enseñarme a trabajar duro para cumplir tus sueños, por creer siempre en nuestro potencial para alcanzar las metas, por enseñarme a tener paciencia y no perderla aunque el camino sea largo.

A mi hermano Daniel por creer siempre en mí y apoyarme en mis decisiones, por estar cuando lo necesito y aportar una sonrisa y un consejo cuando es necesario.

A mi novia Gisela por ser ese impulso de inicio a fin durante la maestría, por ser mi punto de apoyo cuando no comprendía algo, por ser la crítica constructiva de mi trabajo para obtener los mejores resultados y por estar a mi lado cuando la necesitaba en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Silvia por haberme dado la oportunidad de realizar la maestría bajo su tutela, por compartir sus enseñanzas y experiencias, por incentivarme a mantener la pasión por mi trabajo y por el estudio del suelo.

A todas las personas que se cruzaron en mi camino en esta travesía, que directa o indirectamente aportaron en este trabajo.

A mis amigos, a todos ustedes que saben que son mis amigos, por hacer de esta maestría una experiencia gratificante.

A Dios por haberme dado la oportunidad de vivir esta experiencia, que ayudó a forjarme como ser humano y así poder aportar a la conservación de su creación.

Al "Fondo sectorial de Investigación para la Educación SEP-CONACY", por el financiamiento del proyecto 181070. A CONACYT por la beca otorgada 638599

"Y una vez que la tormenta termine, no recordarás como lo lograste, como sobreviviste. Ni siquiera estarás seguro si la tormenta ha terminado realmente. Pero una cosa si es segura. Cuando salgas de esa tormenta, no serás la misma persona que entro en ella. De eso se trata esta tormenta."

Haruki Murakami

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. RESUMEN 1

2. ANTECEDENTES 3

FERTILIZACIÓN DEL SUELO Y AGRICULTURA 3
EL CULTIVO DEL MAÍZ 4
MICORRIZAS 5
HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES (HMA) 6
ENMIENDAS ORGÁNICAS 8
VINAZAS TEQUILERAS 10

3. JUSTIFICACIÓN 14

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 15

HIPÓTESIS 15
OBJETIVO GENERAL 15
OBJETIVOS PARTICULARES 15

5. METODOLOGÍA 16

ETAPA I 17
Selección del sitio de recolección de muestras de suelo y vinazas 17
Muestreo y caracterización del suelo 18
Muestreo y caracterización de las vinazas 18
Análisis fisicoquímicos 19
Suelo 19
Textura 19
pH 20
Conductividad eléctrica (CE) 20
Capacidad de retención de agua (CRA) 20
Contenido de humedad 21
Capacidad de intercambio catiónico (CIC) 21
Carbono orgánico total 22
Nitrógeno inorgánico 23
Nitritos (NO_2^-) – Nitratos (NO_3^-) 23
Amonio (NH_4^+) 23
Nitrógeno total (NT) 24
Fósforo disponible 24
Fósforo total 24
Fenoles 25
Vinazas 25
pH 25
Conductividad eléctrica (CE) 25
Fósforo disponible (fosfatos PO_4^{-3}): 26
Nitritos (NO_2^-) 26
Nitratos (NO_3^-) 26
Amonio (NH_4^+) 26

Nitrógeno total (NT) 27
Demanda química de oxígeno total (DQO) 27
Demanda biológica de oxígeno total (DBO) 27
Sólidos 28
Sólidos totales 28
Sólidos suspendidos totales 28
Sólidos disueltos totales 29
Sólidos volátiles 29
Sólidos sedimentables 30
Materia orgánica (MO) 30
Carbono orgánico (CO) 30
Fenoles 30
Metales pesados 31
Determinación de cationes 31
MICORRIZAS 31
Extracción e identificación inicial de esporas de HMA del suelo. 31
Cálculo de la abundancia relativa de esporas de las especies de HMA 32
Evaluación de la germinación de semillas de maíz a diferentes concentraciones de vinaza *in vitro* 32
ETAPA II 33
Preparación y desarrollo del experimento en invernadero *33*
Pre-germinación de semillas *33*
Establecimiento del experimento en invernadero *33*
Evaluación de la eficiencia fotoquímica de la planta de maíz durante el experimento *35*
Análisis del suelo y de la planta del maíz después del experimento *36*
Determinación del porcentaje de colonización por HMA en las raíces de las plantas *36*
Análisis estadístico *37*

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 38

PRE-EXPERIMENTACIÓN 38
CARACTERIZACIÓN DE LAS VINAZAS 38
CARACTERIZACIÓN DE SUELO 43
DENSIDAD INICIAL DE ESPORAS DE HMA EN EL SUELO PRE-EXPERIMENTACIÓN 46
GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE MAÍZ A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE VINAZA *IN VITRO* 46
CRECIMIENTO DE RADÍCULA E HIPOCÓTILO 48

7. EXPERIMENTACIÓN 49

ANÁLISIS DE CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS DE MAÍZ 49
Altura *49*
Número de hojas *50*
Índice de clorofila (ICC) *51*
Eficiencia fotoquímica *53*
Biomasa *55*
PORCENTAJE DE COLONIZACIÓN 56
DENSIDAD DE ESPORAS DE HMA EN SUELO POST-EXPERIMENTACIÓN 57
ABUNDANCIA RELATIVA DE ESPORAS DE HMA EN EL SUELO 58
ANÁLISIS DE RESULTADOS DEL SUELO 63
pH *63*
Conductividad eléctrica (C.E.) *64*

Carbono orgánico total (CO) *65*
Nitrógeno inorgánico total (NIT) *66*
Fósforo disponible *67*
Fenoles: *68*

8. ANÁLISIS MULTIVARIADO 70

CORRELACIONES DE PEARSON (R) 70
ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES 73

9. CONCLUSIONES 75

10. RECOMENDACIONES 76

11. BIBLIOGRAFÍA 77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos de la superficie sembrada, cosechada y volúmenes de exportación e importación de maíz en Jalisco, México y el mundo.. 5
Tabla 2. Efectos reportados en la literatura sobre la aplicación de vinazas de diferentes industrias (caña, alcoholera, de remolacha y de tequila)..... 12
Tabla 3. Caracterización fisicoquímica de las vinazas tequileras y su comparación con las regulaciones mexicanas y americanas del medio ambiente..... 42
Tabla 4 .Caracterización de suelo y su comparación con regulaciones mexicanas y americanas. 45
Tabla 5. Abundancia relativa de esporas de HMA encontradas en el suelo al inicio (Ti) y final (Tf) de la experimentación..... 60
Tabla 6. Abundancia relativa de esporas de HMA encontradas en el suelo por tratamientos 61
Tabla 7. Concentración acumulada de fenoles totales adicionada por el riego de vinazas en la experimentación..... 69
Tabla 8. Correlaciones de Pearson (r) para todos los parámetros estudiados 72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Corte transversal de raíz con HMA..... 6
Figura 2. Esquema general de las etapas del proyecto y sus principales actividades. 16
Figura 3. Sitio de recolección de muestras de suelo. 17
Figura 4. Área del sitio de muestreo. 17
Figura 5. Triángulo textural 20
Figura 6. Experimento instalado en el invernadero 1 mes después del trasplante previa germinación in vitro. 34
Figura 7 . Porcentaje de germinación de las semillas de maíz durante el tiempo con la aplicación de diferentes tratamientos de vinazas (0%, 25%, 50%, 75% y 100%). 47
Figura 8. Longitud de radícula e hipocótilo a los 10 días de germinación y exposición a diferentes concentraciones de vinaza tequilera (0%, 25%, 50%, 75% y 100%). 49
Figura 9. Altura de las plantas de maíz después de 3 meses de riego con vinaza o agua. 50
Figura 10. Altura máxima final de plantas de maíz con riego de vinazas y agua en la experimentación. 50
Figura 11. Número de hojas en las plantas de maíz. 51
Figura 12. Índice de clorofila de plantas de maíz durante 3 meses de riego con vinaza. 53
Figura 13. Planta de maíz en floración con presencia de araña roja (Tetranychus spp) en el ápice. 53
Figura 14. Eficiencia fotoquímica de plantas de maíz.. 54
Figura 15. Biomasa de plantas de maíz después de tres meses de experimentación de riego con vinaza o agua.. 55
Figura 16 Desarrollo de las plantas del maíz durante los tres meses de experimentación, ... 55
Figura 17 . Porcentaje de colonización en raíz por HMA después de tres meses de riego con vinazas tequileras. 57
Figura 18 . Abundancia de esporas en suelo después de tres meses de cultivo de maíz irrigado con vinazas tequileras. 58
Figura 19 Especies de HMA encontradas durante la experimentación. 62
Figura 20. pH en suelo con el establecimiento de una planta de maíz después de tres meses de ser irrigado con vinazas y agua. 63
Figura 21. CE en suelo con el establecimiento de una planta de maíz después de tres meses de ser irrigado con vinazas y agua.. 64
Figura 22. CO en suelo con el establecimiento de una planta de maíz después de tres meses de ser irrigado con vinazas y agua.. 66
Figura 23. Nitrógeno inorgánico total en suelo con el establecimiento de una planta de maíz después de tres meses de ser irrigado con vinazas y agua. 67
Figura 24. Fósforo disponible en suelo con el establecimiento de una planta de maíz después de tres meses de ser irrigado con vinazas y agua. 68
Figura 25. Concentración de fenoles totales en suelo con el establecimiento de una planta de maíz después de tres meses de ser irrigado con vinazas y agua. 69
Figura 26. Análisis de componentes principales (ACP) 74

1. RESUMEN

En la producción de tequila se genera un efluente como residuo llamado vinaza, en el año 2016 se tuvo una producción de tequila al 55% (alcohol volumen) de 198.8 millones de litros (CRT, 2016); se estima que por cada litro de tequila producido se generan en promedio 10 litros de vinazas, por lo que en el año 2016 se generaron 1988 millones de litros de vinazas aproximadamente.

Un problema con respecto a la generación de vinazas es que una gran cantidad de éstas no recibe tratamiento adecuado o completo para cumplir con las características físicas, químicas y microbiológicas señaladas en la normatividad vigente (NOM-001-SEMARNAT-1996) principalmente las vinazas producidas por pequeñas y medianas empresas que no tienen recursos financieros para el tratamiento de sus efluentes y terminan descargándolos clandestinamente a cuerpos de agua o en los suelos. Se ha estimado que actualmente alrededor del 80% de estas vinazas son descargadas directamente a cuerpos de agua (ríos, arroyos, lagos, presas), sistemas municipales de alcantarillado o directamente al suelo.

Las vinazas por su contenido de materia orgánica (25-60 g DBO L^{-1}) se utilizan para riego de cultivos agrícolas como fuente de nutrientes, sin embargo, no se ha evaluado su efecto en las plantas de cultivo ni en los microorganismos presentes en el suelo, tales como los HMA. Es casi nulo lo que se conoce de cómo cambian los parámetros químicos en el suelo con el riego de las vinazas tequileras. Por tal motivo, en este trabajo se llevó a cabo un experimento a nivel invernadero con plantas de maíz, utilizando dos riegos por semana con vinazas a diferentes concentraciones (V25%, V50% y V75%) y un control regado con agua (W), para evaluar el efecto que tienen las vinazas sobre el crecimiento de la planta de maíz tomada como modelo. Adicionalmente se probaron los mismos tratamientos, sin fertilización (-F) y con una fertilización mínima (+F); este experimento se mantuvo durante tres meses. Se registraron altura, número de hojas, índice de clorofila, eficiencia fotoquímica en hojas, biomasa inicial y final de las plantas.

Al analizar estadísticamente los datos obtenidos se observó que el riego con vinazas disminuye en un 30% la tasa de germinación de semillas de maíz y en el crecimiento de

radícula e hipocótilo desde concentraciones de 25% de vinaza. En plantas adultas, la irrigación con vinaza al 25%, 50% y 75% no efecto altura, número de hojas, el índice de clorofila, la eficiencia fotoquímica, sin embargo hubo una disminución en la biomasa esto debido a la acumulación de compuestos fenólicos y aumento del aporte de sales (K^+, Na^+, Ca^{++}, Mg^{++}) al suelo.

Adicionalmente se evaluaron parámetros químicos del suelo como pH, conductividad eléctrica, carbono orgánico total, nitrógeno inorgánico (NO_2^-, NO_3^-, NH_4^+), nitrógeno inorgánico total, fósforo disponible y fenoles. En las plantas tratadas con vinazas y fertilizante se observó un aumento del 50% en la conductividad eléctrica (C.E) del suelo con respecto a la sola aplicación de vinazas, esto por la acumulación de sales, no se observó diferencias significativas en pH.

Así mismo se evaluó el efecto de las vinazas sobre los HMA, en parámetros como colonización, la densidad y abundancia de esporas en suelo Con respecto a los HMA presentes en el suelo, la adición de vinazas al 75% disminuyó en un 40% la densidad de esporas de manera significativa por un aumento en la disponibilidad de nutrientes, principalmente fósforo y nitrógeno, lo cual es contraproducente para el desarrollo de HMA; adicionalmente, se observó una disminución de un 50% en el porcentaje de colonización de los HMA en las raíces de las plantas de maíz tratadas con vinazas bajo todas las concentraciones.

El fósforo disponible adicionado por vinazas al suelo (67.6-326.7 mg L^{-1}) fue aprovechado por la planta de maíz esto pudiendo deberse a la colonización por HMA, sin mostrar diferencias entre los tratamientos de riego con vinaza y agua, o estaba en forma no disponible (en forma de biomasa microbiana o ligado a materia orgánica).

No obstante lo anterior, hubo un efecto positivo observado durante la aplicación de vinazas, donde aumentaron el carbono orgánico total y el nitrógeno inorgánico en el suelo, los cuales pueden ser aprovechados por las plantas de maíz.

2. ANTECEDENTES

FERTILIZACIÓN DEL SUELO Y AGRICULTURA

El aumento exponencial de la población humana en los últimos años, de 7 mil millones de personas en el 2012 a más de 9 mil millones proyectado al 2050 (OECD, 2012), ha generado una creciente necesidad por la producción de alimentos, lo cual ha llevado a mejorar la eficiencia de producción de los suelos agrícolas en cuanto a rendimiento y calidad.

La nutrición de las plantas es uno de los factores más importantes para el control del rendimiento y de la calidad de la producción agrícola, por lo que los productores optan por la aplicación de fertilizantes químicos, el combate a plagas, el mejoramiento en los sistemas de riego y por prácticas agrícolas eficientes.

La práctica de fertilización de los suelos es una de las herramientas más utilizadas en los últimos años. El consumo de fertilizantes inorgánicos ha ido en aumento, de acuerdo con el Banco Mundial el consumo de fertilizantes por hectárea de suelo dedicada a cultivos en el mundo en el año 2014 fue de 1358 kg Ha^{-1}, mientras que en México fue de 83.6 kg Ha^{-1}, el cual corresponde al 0.6% del total mundial y al 63% en América Latina y el Caribe (124.7 kg Ha^{-1}).

Brasil, Argentina, México y Colombia constituyen los principales usuarios de fertilizantes en la región de Latinoamérica y el Caribe. De acuerdo con estimaciones de la Organización Mundial para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés), la demanda mundial de fertilizantes crecerá alrededor de 1.8% por año desde el 2014 hasta el 2018, siendo pronosticado para finales del 2018 un total 200,500 toneladas necesarias para satisfacer la demanda mundial.

Por otro lado, el porcentaje de producción de fertilizantes inorgánicos a nivel mundial fue del 91.2% (el 8.8 % restante fue utilizado para uso industrial como ingredientes). El índice de precios de fertilizantes del Banco Mundial pronostica un descenso de casi un 15% en el año

2014 y un 1,5% adicional en 2015. Durante el año 2013, hubo una disminución del 17% en el índice de precios de fertilizantes (FAO, 2015).

Los fertilizantes inorgánicos contienen sales de fosfatos, nitratos, amonio y potasio, y metales pesados como Hg, Cd, As, Pb, Cu, Ni, lo cual causa una serie de problemas ambientales, tales como la salinización de los suelos, la acumulación de metales pesados, la eutrofización de cuerpos de agua y la acumulación de nitratos, así como la contaminación del aire por amoniaco (NH_3), óxido nitroso y óxido nítrico (N_2O y NO) (Savci, 2012).

Dentro de las posibles soluciones a los problemas actuales por las prácticas agrícolas, se ha propuesto mejorar el rendimiento de los cultivos con el uso eficiente de los fertilizantes para evitar la fertilización excesiva, limitar el riego de los cultivos tras la fertilización, usar fertilizantes de liberación lenta, abonos verdes o enmiendas orgánicas (Moreno, 2016) .

EL CULTIVO DEL MAÍZ

El maíz es endémico de la región norte del continente, y estuvo relacionado con el desarrollo de las culturas indígenas antes de la aparición de México como nación (Sweeney *et al*. 2013). Actualmente el consumo de maíz en México es alrededor de 267 g/persona/día. Aportando como alimento almidón (72%), proteína (10%) y grasa (4%); así como vitamina B, minerales esenciales y fibra (Ranum *et al*., 2014). El consumo humano de maíz como alimento se ha mantenido, además de los diversos usos que se le puede dar a esta planta para producir aceites, harinas, almidones y materia prima en la industria, así como alimento para el ganado.

Estados Unidos, China, Brasil, la Unión Europea y México son los mayores productores de maíz, siendo Estados Unidos y China los que producen el 60% de la producción mundial. El estado de Jalisco ocupa el 1er y 2do lugar en la producción nacional de maíz forrajero y de grano respectivamente (SIAP-SAGARPA, 2013). A pesar de ser productor de maíz, México es un importador de maíz en crecimiento (Ranum *et al*., 2014), de acuerdo a lo reportado por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, en el año 2015 se importó alrededor de 256 toneladas de maíz forrajero y 730,063 toneladas de maíz en grano para poder satisfacer la demanda del país.

Tabla 1. Datos de la superficie sembrada, cosechada y volúmenes de exportación e importación de maíz en Jalisco, México y el mundo. Fuente Atlas Agroalimentario 2016. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP).

Maíz		
Tipo	Forrajero	Grano
Posición de México en la producción mundial	10º	7º
Superficie sembrada en el año 2015 (M Ha)	564	7,600
Superficie cosechada en el año 2015 (M Ha)	539	7,100
Volumen exportado (t)	78,791	11,974,519
Volumen importado (t)	256	730,063
Posición de Jalisco en la producción nacional	1º	2º
Volumen producido en el año 2015	3,701,931	3,338,766
% del volumen producido a nivel nacional	27	13

t: Toneladas

Se estima que en el mundo las hectáreas de suelo destinadas a cultivos de cereales en el año 2014 fueron 720,666,270 Ha, de las cuales México presenta una superficie de 10,197,216 Ha (1.4%) dedicado a esta actividad, la cual obtuvo 36,526,604 toneladas métricas de producción, que equivalen al 25% de la producción mundial de cereales (Banco Mundial, 2016). Así mismo, de acuerdo con el Banco de México durante el año 2015, el 25% del producto interno bruto (PIB) del país correspondió a la actividad primaria, es decir a la producción de cultivos. Lo anterior refleja la importancia del cultivo de cereales, en específico del maíz en México como fuente de ingreso y alimentación de la población.

Para mejorar la producción y rendimiento de los campos de cultivo y para reducir el consumo de fertilizantes químicos, se presentan una serie de alternativas biotecnológicas, como el uso de microorganismos que ayuden a la captación y asimilación de nutrientes, tales como bacterias y hongos benéficos (i.e. hongos micorrízicos arbusculares), así como la utilización de enmiendas orgánicas con residuos sólidos y líquidos para su aprovechamiento. Las cuáles serán descritas brevemente para situar el contexto de este trabajo.

MICORRIZAS

Las micorrizas (nombre proveniente del griego que significa “myce”= hongo y “rhiza”= raíz se pueden denominar como “hongo raíz”), son la asociación simbiótica de las plantas con un grupo particular de hongos del suelo (Camargo-Ricalde *et al*., 2012).

Existen dos tipos básicos de asociaciones micorrízicas: ectomicorrizas y endomicorrizas; las cuales difieren entre sí por el grado de invasión del hongo con respecto a la raíz. En el caso de las ectomicorrizas la colonización de la raíz por los hongos se da dentro de las células la raíz, en las cuales se desarrollan estructuras hifales diferenciadas como vesículas y arbúsculos (Atlas y Bartha, 2001)

La unión entre las micorrizas y las raíces de las plantas tiene la particularidad de que ambos se ven beneficiados: la raíz aprovecha los nutrimentos que el hongo toma del suelo y que traslada a la planta; a su vez, el hongo toma de la planta el carbono necesario para su desarrollo (Íñiguez-Covarrubias y Peraza-Luna, 2007).

HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES (HMA)

Una forma generalizada de endomicorrizas son las denominadas vesículo-arbusculares (VA) o también conocidos como hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Se caracterizan por los arbúsculos, estructuras que desarrollan en el interior de la célula de la raíz por ramificación dicotómica repetida de sus hifas (Sánchez-Viveros *et al*., 2004).

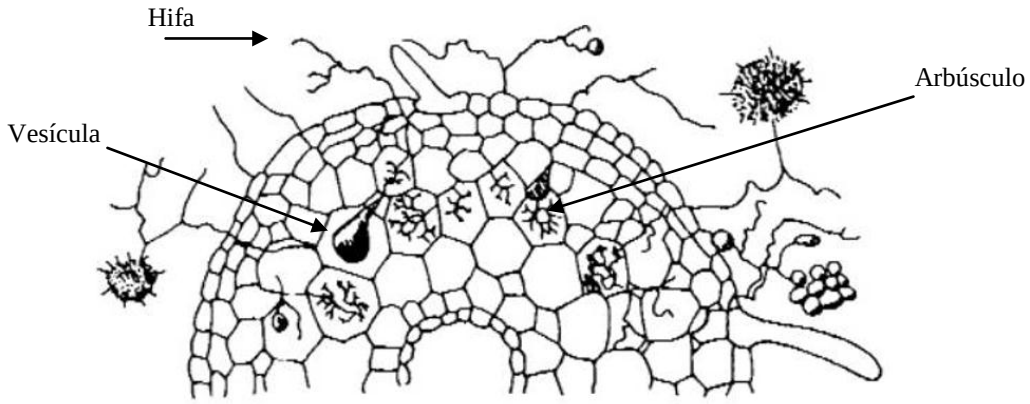

Figura 1 Corte transversal de raíz con HMA. Adaptado de (Atlas y Bartha, 2001)

Los HMA pertenecen a la División Glomeromycota (Parniske, 2008). Son los que presentan mayor asociación con plantas vasculares, el 83% de las dicotiledóneas, el 79% de las monocotiledóneas, así como todas las gimnospermas en general (Wilcox, 1991); siendo este

tipo de micorriza la de mayor interés para la agricultura, dada su afinidad con la mayoría de las plantas cultivadas, así como por los beneficios que aportan.

Las micorrizas aumentan la tolerancia de las plántulas a la sequía, a altas temperaturas, a toxicidad por metales pesados, a la infección por hongos fitopatógenos e incluso a la acidez extrema del suelo (Atlas y Bartha, 2001). Esto debido a que mejoran la captura de P, N, incrementan la captación de micronutrientes y de agua, entre otros, extendiendo el alcance de la raíz y secretando sustancias como enzimas (fosfatasas, nitrogenasas, etc.) para hacer disponibles estos elementos (Almagrabi *et al*., 2012). De tal manera que las micorrizas son utilizadas en la actualidad en sistemas de bajo ingreso y agricultura sostenible, y pueden ser útiles para reducir la aplicación de fertilizantes químicos.

El establecimiento de la simbiosis micorrízica va a depender de las interacciones entre los tres componentes más importantes del sistema: el hongo, las plantas y las condiciones ambientales. Este último punto es importante señalarlo, dado que las perturbaciones ocasionadas por las actividades antropogénicas, una de las cuales es el uso de enmiendas orgánicas, pueden alterar las condiciones del suelo y por lo tanto ejercer efectos negativos o positivos en los microorganismos que ahí se desarrollan. Por ejemplo, la degradación ambiental por las actividades mineras ha reducido la diversidad filogenética en la comunidad de HMA en el suelo, llevando a las comunidades a ser dominadas por una sola familia, ej. Glomeraceae (Montiel-Rozas *et al*., 2016). Además, se ha reportado la disminución en el crecimiento hifal o ausencia de germinación de los HMA en medio salino (Campagnac y Khasa, 2014). Por otra parte, la aplicación de lodos composteados al suelo reduce la abundancia relativa y el desarrollo de los HMA (Jacquot-Plumey *et al*., 1996). Velásquez-Pomar y Sánchez Prager, (2001) encontraron que con el riego de vinazas alcoholeras hubo un incremento en la longitud del micelio externo de HMA y una disminución de glomalina de HMA en el suelo.

Sin embargo, se han reportado también efectos positivos con la combinación de enmiendas orgánicas controladas y la adición de HMA en el crecimiento y nutrición de las plantas (Curaqueo *et al*., 2014). La aplicación de efluentes de pulpa de papel al suelo mejora la micorrización de las plantas e incrementa la cantidad de esporas de HMA (Thangavelu y Sivalingam, 2010). Así mismo Gryndler *et al*., (2006) reportaron mayor colonización de HMA al aplicar composta de algas marinas y abono de ganado.

Desde el punto de vista ecológico, la presencia, la utilización y/o la aplicación de los HMA permite reducir el uso de energía, la degradación del ecosistema y las pérdidas de nutrientes de los suelos agrícolas. Además, se mantiene la capacidad productiva del sistema, se preserva la biodiversidad y se contribuye con una producción más estable y sostenida a largo plazo en equilibrio con el entorno (Hernández, 2000). Debido a esto, la presencia de los HMA en un suelo de cultivo es importante y favorece al sistema agrícola.

ENMIENDAS ORGÁNICAS

Se define como enmienda al aporte de un producto fertilizante o de materiales destinados a mejorar la calidad de los suelos. La necesidad de recuperación de suelos degradados o con deficiencia de materia orgánica, se ha incrementado en las últimas décadas, siendo las enmiendas orgánicas una alternativa económica, eficiente y moderadamente rápida para este fin (Zambrano *et al*., 2013).

La adición de residuos orgánicos en los suelos en conjunto con fuentes de nutrientes inorgánicos (fertilizantes) ha dado como resultados la mejora de los rendimientos de algunos cultivos agrícolas, como maíz, trigo y arroz, entre otros en contraste con la sola aplicación de fertilización inorgánica (Güereña *et al.*, 2016). Se ha documentado que la aplicación de enmiendas orgánicas en el suelo puede incrementar el contenido de materia orgánica, los nutrientes esenciales (N, P, K^{+}, Mg^{++}, Na^{+} y Ca^{++}) y disminuir la solubilidad de metales pesados, su biodisponibilidad y su absorción por las plantas (Odalipo *et al.*, 2016).

De acuerdo con Chen (2008), el uso de enmiendas orgánicas presenta ventajas con respecto a los fertilizantes inorgánicos tales como:

- Proporciona un suministro balanceado de nutrientes, manteniendo las plantas sanas.
- Mejora la actividad biológica del suelo, la movilización de nutrientes de fuentes orgánicas y químicas y la descomposición de sustancias tóxicas.
- Incrementa la colonización de las micorrizas, lo que ayuda a la captura de fósforo (P).
- Promueve el crecimiento de las raíces de las plantas debido a una mejor estructura del suelo.

- Aumenta el contenido de materia orgánica del suelo, mejorando así la capacidad de intercambio de nutrientes, aumentando la retención de agua en el suelo, promoviendo agregados del suelo y amortiguándolo contra la acidez, alcalinidad, salinidad, así como del efecto tóxico de pesticidas y metales pesados.
- Libera nutrientes lentamente y contribuye a la reserva residual de N y P orgánico en el suelo, reduciendo la pérdida de lixiviación de N y la fijación de P.
- Suministrar micronutrientes tales como Fe, Zn y Mn.
- Proporciona alimento y fomenta el crecimiento de microorganismos benéficos y lombrices de tierra, lo cual promueve la fertilidad y calidad del suelo.
- Ayuda a suprimir ciertas enfermedades de las plantas transmitidas por patógenos y algunos parásitos que viven en el suelo.

Las enmiendas orgánicas se pueden clasificar por su origen como: subproductos orgánicos de origen animal (guanos, estiércoles y purines), subproductos orgánicos de origen vegetal (residuos de jardinería, residuos de cosechas, entre otros), lodos del tratamiento de residuos industriales líquidos (lodos de aguas residuales urbanas, lodos de industrias, lodos de procesos productivos como pisciculturas, entre otros), subproductos de la industria o actividades productivas (cal de la industria de azúcar, conchas de envasadoras de mariscos, mataderos, etc.) y aguas residuales de plantas de tratamiento con contenido elevado de materia orgánica (urbanas e industriales) (Sperberg y Juan Hirzel Campos, 2011).

La selección en la calidad de la enmienda orgánica a utilizar puede llegar a influir en el efecto que tendrá en el suelo y en el cultivo a corto y largo plazo. A largo plazo, una mejora en la fertilidad en el suelo por el secuestro de contenido orgánico. A corto plazo la inmovilización de N, como biomasa en microorganismos, reduciendo su disponibilidad para las plantas (Güereña *et al*., 2016).

El uso de enmiendas orgánicas contra la fertilización química tiene el potencial de optimizar el nitrógeno en los suelos, al aumentar las poblaciones de los microorganismos que utilizan el C y el N en el suelo. Pero para esto es necesario entender los procesos de descomposición de la materia orgánica de la enmienda y su utilización por los microorganismos del suelo (Heijboer *et al*., 2016). Por ejemplo, la aplicación de enmiendas orgánicas a suelos contaminados por

metales pesados, ayudan a la inmovilización de éstos a través de la complejación con la materia orgánica (Oladipo *et al*., 2016).

Los grandes volúmenes de producción de lodo, por el tratamiento de aguas residuales urbanas e industriales, ha traído como consecuencia que estos no sean de un material de fácil manejo por lo que se han buscado distintos destinos o vías de utilización en el tiempo (Cuevas *et al*., 2006). Una de las opciones es la aplicación de lodos al suelo para reciclar estos desechos, ya que un 80% del material es reutilizable (materia orgánica), además de generar mejoras en la productividad y recuperación de suelos degradados (Marambio y Ortega, 2003)

VINAZAS TEQUILERAS

Se pueden definir como vinaza tequileras a los efluentes de la producción del tequila. Son residuos líquidos generados durante la producción del tequila, después de la destilación del mosto de agave. Por cada litro de tequila producido se generan en promedio 10 litros de vinazas (López-López *et al*., 2010). Por lo tanto, si en el año 2016 se obtuvo una producción de tequila al 55% de 198.8 millones de litros (Consejo Regulador del Tequila, 2016b), se estima que se produjeron 1988 millones de litros de vinazas.

Las vinazas tequileras se caracterizan por su elevada concentración de materia orgánica de 35,000 a 60,000 mg L^{-1} como DBO y 60,000-100,000 como DQO; un pH ácido de 3 a 4; una coloración café oscura debido a la presencia de melanoidinas y taninos; una alta concentración de sólidos totales de 37,500 a 79,000 mg L^{-1}; y de sólidos totales volátiles de 79,000 a 82,222 mg L^{-1}, y K^{+} de 10 a 345 g L^{-1} (Moran-Salazar *et al*., 2016).

Las características de las vinazas tequileras pueden variar dependiendo de las diferencias entre las condiciones de operación del proceso (López-López y Contreras-Ramos, 2015). En general existen dos: 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 *et al*., 2015). La composición de las vinazas en el proceso tradicional tiene mayor contenido de compuestos como el furfural, furano y furanona que el proceso por difusor como demostraron Rodríguez-Félix *et al*., (2016).

La característica de las vinazas de tener una elevada carga orgánica, ha hecho pensar que su aplicación al suelo puede ser benéfica para aprovechar esa materia orgánica como una enmienda orgánica que proporcione nutrientes al suelo, con antecedentes de su uso para la fertirrigación en Brasil (Dematthê *et al*., 2004; Fuess y Garcia, 2014).

La aplicación directa de las vinazas puede modificar las propiedades fisicoquímicas del suelo, tal como ha sido reportada en algunos trabajos (ver tabla 2), cambiando la salinización, sodicidad, obstrucción de poros, reducción de la actividad microbiana, desestabilización de la estructura del suelo por el alto contenido de Na^{+}, K^{+}, Ca^{++} y Mg^{++}, acidificación, contaminación por metales tóxicos, y también puede aumentar las emisiones de gases de efecto invernadero (Moran-Salazar *et al*., 2016), entre otros efectos.

En otros países también se producen vinazas procedentes de la industria del alcohol. En Brasil, India, China, Pakistán, Tailandia, México, Colombia, Australia, Sudáfrica y Cuba se producen vinazas de caña de azúcar. En Europa (Alemania, Francia, Polonia y Reino Unido), Norte América (Canadá y Estados Unidos), Asia (Corea del Sur, Japón) y la India se producen vinazas de remolacha. Las características de dichas vinazas varían por la materia prima utilizada para su producción, sin embargo comparten diferentes características como son la elevada carga orgánica y el pH ácido (Moran-Salazar *et al*., 2016).

Diversos autores han mostrado que el aprovechamiento de las vinazas de otras industrias presentan efectos positivos y negativos cuando se adicionan al suelo (Tabla 2). Aunque es importante considerar que los efectos serán dependientes de la dosis de aplicación, del tipo de suelo y sus características, de las condiciones climáticas y del tipo de plantas, entre otras.

Tabla 2. Efectos reportados en la literatura sobre la aplicación de vinazas de diferentes industrias (caña, alcoholera, de remolacha y de tequila).

VINAZA	EFECTO	CONCLUSIÓN	FUENTE
Caña	Positivo	Aumento en la microbiota: bacterias y hongos en el suelo.	Santos *et al*., 2008
Alcoholera	Positivo	Mejora moderada en el rendimiento de la caña.	Soobadar y Ng Kee Kwong, 2012
Alcoholera	Positivo	Fuente de potasio que ayudará a la disminución de fertilizantes potásicos en cultivo de caña.	Bautista Zúniga y Durán de Bazúa, 1998
Alcoholera	Positivo	Fuente de materia orgánica, N, P y K; podría sustituir fertilizantes químicos (NPK) para el cultivo de caña.	Pineda Ruiz *et al*., 2015
Alcoholera	Positivo Negativo	Incremento en la longitud del micelio externo de HMA y disminución de glomalina por un gradiente de concentración de las vinazas en el suelo.	Velásquez-Pomar y Sánchez Prager, 2001
Alcoholera	Negativo	Inhibición en la germinación de semillas de jitomate, calabaza, pepino y cebolla con vinaza alcoholera	Ramana *et al*., 2002.
Alcoholera	Negativo	Desbalance en el contenido de Ca^{+2}, Mg^{+2}, K^{+} y Na^{+} al aplicar sucesivas dosis de vinazas y promoción de la capacidad de infiltración del suelo.	Silva *et al*., 2007
Alcoholera	Negativo	Aumento de la salinidad y la C.E. en suelo por la aplicación de vinazas crudas.	Bautista Zúñiga *et al.*, 1998
Alcoholera	Negativo	Disminución en el vigor de las semillas de maíz, aumentando el tiempo de germinación.	Pereira *et al.*, 1992
Alcoholera	Negativo	Disminución en el desarrollo del vástago y de la raíz de maíz.	Bebé *et al.*, 2008
Remolacha	Negativo	Disminución de la estabilidad estructural del suelo (25% - 49%) en la biomasa microbiana.	Tejeda *et al*., 2007
Alcoholera	Negativo	Menor colonización de micorrizas en el suelo, no se encontró una correlación entre rendimiento del maíz, dosis y época de aplicación de vinazas.	Montenegro, 2008
Alcoholera	Negativo	Afectación a los mecanismos del suelo por medio de la acidificación para el intercambio de iones como K+, Mg+2, Ca+2 y lixiviación de algunos metales (Fe, Zn, Cr y Ni) en condiciones aerobias.	Renault *et al*.,2009
Alcoholera	Negativo	Disminución en la tasa de germinación de semillas de *Vigna angularis*, *V. cylindrical* y *Sorghum cernum*)	Doke *et al*., 2011
Tequila	Negativo	Aumento en la presencia de organismos patógenos (*Fusarium oxysporum* y *F. solani*) para algunos cultivos cultivos de *Agave tequilana* Weber variedad azul.	Amador, 2002
Tequila	Negativo	Inhibición de la germinación de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*)	Nalleli, 2004
Tequila	Negativo	Inmovilización del nitrógeno, nutrientes no disponibles para las plantas y emisión de gases de efecto invernadero (GEI).	Morán Salazar *et al*., 2016
Tequila	Negativo	Concentraciones superiores a 50% de vinazas tequileras afectan negativamente la abundancia de esporas de HMA.	Sánchez-Lizárraga, 2015

Resalta el hecho que son muy pocos los trabajos encontrados en la literatura sobre el efecto de las vinazas tequileras en cultivos agrícolas y en suelos cuando se utilizan como enmienda orgánica, y es nula la información acerca de su efecto sobre la asociación de las poblaciones de hongos micorrízicos y las plantas.

Los estudios referidos (Tabla 2) son sólo algunos de los trabajos que han probado el uso de las vinazas principalmente de la industria alcoholera y de remolacha. Sin embargo, los efectos de las vinazas tequileras sobre los cultivos agrícolas y las poblaciones microbianas son sólo cuatro, por lo que es importante saber acerca de los cambios en el suelo, de las poblaciones de hongos micorrízicos en su asociación a cultivos agrícolas por la disposición de vinazas en el suelo, así como su efecto sobre el crecimiento del cultivo. Por tal motivo, en el presente trabajo se estudió el efecto del riego de vinazas de tequila a diferentes concentraciones, en un cultivo de maíz, comparando el efecto con y sin fertilización del cultivo, con el objeto de generar conocimiento que sirva de base para entender si las vinazas afectan o favorecen el cultivo, a algunas características químicas del suelo y a una de las asociaciones mutualistas importantes para las plantas, como es la simbiosis con HMA.

3. JUSTIFICACIÓN

Existen diferentes investigaciones sobre los efectos que ocasionan en suelos y en cuerpos de agua las vinazas alcoholeras y de la remolacha. Sin embargo, la información sobre la afectación o beneficio en el crecimiento de los cultivos agrícolas cuando se realiza el riego con vinazas tequileras como fuente de nutrientes es nula. Y es poco el conocimiento que se tiene de los efectos de las vinazas tequileras sobre los procesos del suelo y las poblaciones microbianas, concretamente los hongos micorrízicos arbusculares que habitan el suelo. De tal manera que es importante poder generar conocimientos acerca de qué afectación o beneficio pueden producir las vinazas de tequila cuando son aplicadas a cultivos agrícolas, al suelo y a los HMA que forman simbiosis con dichos cultivos.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

El crecimiento del cultivo de maíz será afectado negativamente por la aplicación de vinazas tequileras al suelo, y el porcentaje de colonización, número de especies y densidad de esporas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) disminuirá.

Objetivo general

- Evaluar el desarrollo de plantas de maíz y la asociación planta-hongos micorrízicos arbusculares con la aplicación de vinazas tequileras como fuente de nutrientes.y compararlo con una fertilización mínima a nivel invernadero

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de diferentes dosificaciones de vinazas tequileras sobre el crecimiento de un cultivo de maíz y compararlo con una fertilización mínima en condiciones de invernadero.
- Evaluar el efecto de diferentes dosificaciones de vinazas tequileras sobre la colonización por hongos micorrízicos arbusculares en las raíces de las plantas de maíz.
- Evaluar el efecto de diferentes dosificaciones de vinazas tequileras sobre las poblaciones de esporas de hongos micorrízicos arbusculares en la rizosfera de las plantas de maíz.
- Evaluar el efecto de diferentes dosificaciones de vinazas tequileras sobre algunas características fisicoquímicas del suelo durante el cultivo de maíz.

5. METODOLOGÍA

Este trabajo se dividió en dos etapas: durante la primera se muestreo y caracterizó el suelo (fisicoquímicamente y en abundancia e identificación de esporas de HMA) y la vinaza con la que se trabajó. Se realizó una prueba presuntiva para evaluar los posibles efectos tóxicos de las vinazas sobre la germinación de maíz. Mientras que durante la segunda etapa se llevó a cabo la experimentación en el invernadero, después de cuya conclusión se evaluaron todos los parámetros químicos del suelo, la colonización por HMA en las raíces de maíz y la densidad de esporas de HMA en la rizosfera, con su respectivo análisis estadístico final.

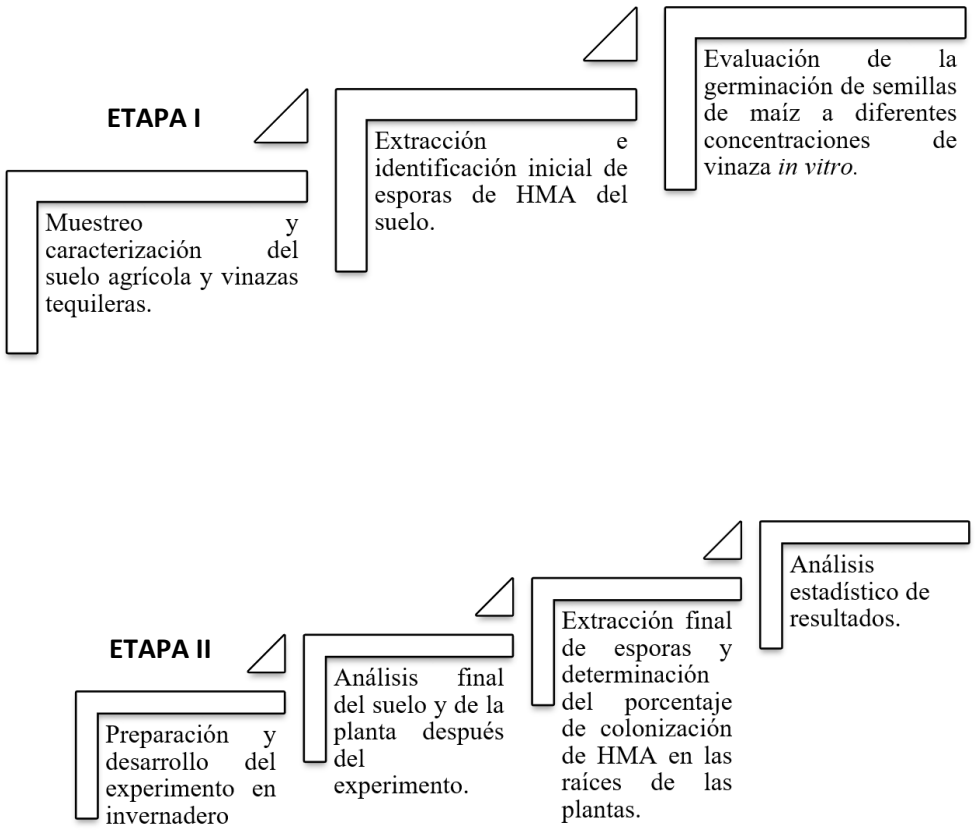

Figura 2. Esquema general de las etapas del proyecto y sus principales actividades.

ETAPA I

Selección del sitio de recolección de muestras de suelo y vinazas

El sitio seleccionado para la recolección del suelo fue un campo agrícola con cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). El sitio se localiza en el municipio El Arenal (20° 46’ 7’’N y 103° 41’ 18’’ O), al noroeste del estado de Jalisco (Figura 4).

El suelo utilizado se colectó de una zona con antecedentes de no tener riego de vinazas, la cual se muestra en la figura 3.

Figura 3. Sitio de recolección de muestras de suelo.

Figura 4. Área del sitio de muestreo; los números dentro de las estrellas representan las parcelas muestreadas. Google Earth® (13 de enero de 2015).

Se recolectaron vinazas de dos destiladoras de tequila con un proceso de producción tradicional (horno de mampostería), con la finalidad de contar con suficiente vinazas para todo el desarrollo del proyecto, debido a que la producción de tequila no se realiza durante todo el año y es estacional. Estas fueron almacenadas bajo refrigeración durante la experimentación.

Muestreo y caracterización del suelo

Se realizó un muestreo utilizando la metodología expuesta en la Norma Oficial Mexicana NMX-AA-132-SCFI-2006. El área del cultivo fue dividida en dos zonas principales (zona de riego con y sin vinazas), el área sin riego con vinazas se denominó Suelo Control (SC) y fue la de interés para este trabajo.

Las muestras de suelo control se recolectaron aleatoriamente dentro del campo de cultivo, dividiendo el área en tres campos, teniendo un total de 21 puntos de muestreo que representaran adecuadamente las propiedades del suelo. Las muestras de suelo posteriormente fueron homogeneizadas y tamizadas con una malla de 5 mm de apertura para eliminar restos de vegetación y piedras.

Se efectuó una caracterización fisicoquímica del suelo: textura, pH, conductividad eléctrica (CE), capacidad de retención de agua (CRA), contenido de humedad, capacidad de intercambio catiónico (CIC), carbono orgánico total, nitrógeno inorgánico (nitritos, nitratos y nitrógeno amoniacal), nitrógeno total (NT), fósforo disponible (PO_4^{-3}), fósforo total (PT) y metales pesados, por los métodos descritos posteriormente. Las metodologías utilizadas fueron las propuestas en la NOM-021-SEMARNAT-2000 (2000), la NMX-FF-109-SCFI-2007 (2007) y el manual de Métodos de Análisis de Suelos (Mattigod y Zachara, 1996) o la EPA 6010B.

Muestreo y caracterización de las vinazas

Las muestras de vinaza se colectaron de la línea de salida inmediatamente después del proceso de destilación, en recipientes plásticos y por triplicado (n=3). Estas fueron caracterizadas fisicoquímicamente para: pH, conductividad eléctrica (CE), fósforo disponible (medido como PO_4^{-3}), fósforo total (PT), materia orgánica (MO), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-), amonio (NH_4^+), nitrógeno total (NT), demanda química de oxígeno total (DQO), demanda biológica

de oxígeno total (DBO), sólidos totales, sólidos suspendidos, sólidos volátiles, sólidos disueltos, sólidos sedimentables, materia orgánica, carbono orgánico, fenoles, metales pesados y cationes de acuerdo con los métodos que se describen posteriormente.

Análisis fisicoquímicos

Suelo

Textura

La textura del suelo fue determinada mediante el método de Bouyoucos. Se pesaron 100 g de suelo, a la muestra se le adicionó agua destilada hasta cubrir la superficie, posteriormente se adicionaron 5 mL de $(NaPO_3)_6$ mezclándolo en un agitador mecánico para homogenizar la muestra. La muestra mezclada se colocó en una probeta de 1 L en donde fue introducido un hidrómetro. La primera medición con el hidrómetro se realizó a los 40 segundos, para medir partículas de diámetro mayor a 0.05 mm. Después de 2 horas se realizó otra medición con el hidrómetro para medir partículas de diámetro mayor de 0.002 mm (NOM-021-SEMARNAT-2000). La textura fue determinada mediante lectura del hidrómetro, haciendo una corrección con las siguientes fórmulas para obtener los porcentajes de arcilla, limo y arenas:

Lectura 40 segundos * 2 = % Arcilla + Limo

Lectura 2 horas * 2 = % Arcilla

(100 - % Arcilla) + Limo = % Arena

(% Arcilla + Limo) - % Arcilla = % Limo

La textura fue clasificada de acuerdo con el triángulo textural (Figura 5).

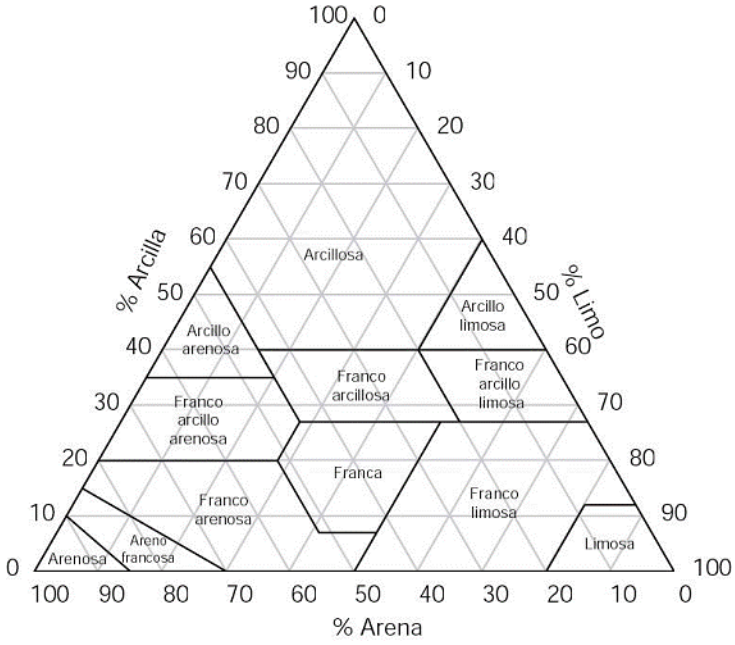

Figura 5. Triángulo textural (FAO, 2015)

pH

Se realizó la medición del pH de acuerdo con la NMX-FF-109-SCFI-2008, pesando 5 g de suelo a los que se adicionaron 25 mL de agua destilada, en una mezcla con una relación 1:5 (p/v), se agitó durante 5 minutos, posteriormente se sumergió el electrodo del potenciómetro (Oakton pH/conductivity 300 meter, Singapore) durante un minuto en la muestra hasta que la lectura se estabilizó (NOM-021-SEMARNAT-2000).

Conductividad eléctrica (CE)

Se determinó la conductividad eléctrica (CE) en una mezcla de suelo y agua destilada en una relación 1:5 (p/v), para ello se tomaron 5 g de suelo y se les adicionó 25 mL de agua destilada, posteriormente se llevó a agitación durante 15 minutos, se centrifugó a 2000 r.p.m., y el sobrenadante se utilizó para hacer la medición. Se determinó la CE introduciendo el electrodo del conductímetro (Oakton pH/conductivity 300 meter, Singapore) registrando la lectura una vez que ésta se estabilizó (NOM-021-SEMARNAT-2000).

Capacidad de retención de agua (CRA)

La capacidad de retención de agua (CRA) se determinó mediante la técnica descrita por Daney y Top (2002). En la cual se pesaron 20 g de suelo seco en un cono de papel filtro registrando ambos pesos (suelo y papel), posteriormente el cono con el suelo se colocó en un embudo y se

le adicionó 100 mL de H_2O hasta saturación, dejándolo reposar y tapado durante 24 horas. Se realizó el mismo procedimiento con un cono de papel filtro sin suelo para considerarlo como blanco y saber cuánta agua absorbe el papel. Pasado el tiempo se pesó cada cono con el suelo húmedo y el blanco. Los pesos se utilizaron en la siguiente fórmula para determinar la CRA (NOM-021-RECNAT, 2000):

$$\% \, CRA = peso \, final - (peso \, de \, papel * 1.23) - (g \, muestra * \frac{(100 - \% \, humedad)}{100} * \frac{100}{g \, muestra * (100 - \% \, humedad)}$$

Contenido de humedad

Se determinó la humedad siguiendo el método AS-05 de la NOM 021, donde inicialmente se llevaron a peso constante los crisoles de porcelana, dejándolos durante 24 h en estufa; posteriormente se colocaron dentro de un desecador para atemperarse y se registró el peso. Después se pesaron 2 g de suelo de cada una de las muestras y se colocaron en los crisoles, se colocaron en la estufa a 105 ºC durante 1 h para remover la humedad presente en la muestra. Se registró el peso seco de cada muestra y con los resultados se aplicó la siguiente fórmula:

$$Contenido \, de \, humedad \, gr = \frac{(PB + Psh) - (PB + Pss)}{(PB + Pss) - PB}$$

Donde:

PB: Peso del crisol (g)

Psh: Peso de suelo húmedo (g)

PB+Psh: Peso de crisol seco más peso seco del suelo húmedo (g)

PB+Pss: Peso del crisol más peso del suelo seco (g)

Capacidad de intercambio catiónico (CIC)

Para determinar de la capacidad de intercambio catiónico (CIC) en el suelo se colocaron 2 gramos de suelo en base seca y se agregó 25 mL de $BaCl_2$ 0.6 M, se mezclaron en vortex y se centrifugó la solución separando el suelo, al centrifugado se le añadió 25 mL de solución de $MgSO_4$ (aproximadamente 0.1 N) y se centrifugó nuevamente. Después de esta última

centrifugación se tomaron 10 mL de solución sobrenadante transparente y se diluyeron a 100 mL con H_2O destilada. Finalmente se adicionó solución tampón (que contenía NH_4Cl 1 N e NH_4OH 1 N) y 6 gotas de Negro de Eriocromo T (0.2%) y se valoró con solución de EDTA 0.05 N (Uehara y Gillman, 1981). Para calcular la CIC se aplicó la siguiente fórmula:

$$CIC = (M - N) * \frac{0.05 * 25 * 100}{P} = (M - N) * \frac{12.5}{P}$$

Donde:

M= Volumen de solución complejante para valorar el blanco (mL)

N= Volumen de solución complejante para valorar la muestra (mL)

P= Peso de la muestra (g).

2.5 = Factor de dilución (25:10)

0.05 = normalidad del EDTA

Carbono orgánico total

Para la obtención del carbono orgánico total (COT) se pesaron 5 g de muestra de suelo y se colocaron en un crisol previamente seco y a peso constante. Posteriormente se llevó a calcinación a 550 ºC en una mufla (marca Vulcan modelo A-550, País) durante 2 horas. Después se enfriaron los crisoles en un desecador, se obtuvo el peso y se calcularon los valores con las fórmulas siguientes propuestas por la NMX –FF-109-SCFI-2008:

$$\%\ Cenizas\ = \frac{PCC - PC}{M} * 100$$

Donde:

PCC= Peso del crisol (g) + ceniza (g)

PC= Peso del crisol (g)

M= Peso de la muestra (g)

$$\%\ Materia\ org\acute{a}nica\ (M.O.)\ = 100\% - \%\ Ceniza$$

$$\%\ Carbono\ org\acute{a}nico\ total\ = \frac{\%\ M.O.}{1.724} * 100$$

Dónde:

1.724 = Factor Van Benmelen

Nitrógeno inorgánico

Para determinar el nitrógeno inorgánico (NO_3^-, NO_2^-, NH_4^+) en el suelo se preparó un extracto con 5 g de suelo y 20 mL de K_2SO_4 0.5 M en una relación 1:4 (p/v). La mezcla fue agitada en un agitador orbital (Orbital shaker, Modelo: TS-100) durante 5 minutos para disgregar el material y después se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min, en el sobrenadante se determinaron NO_3^-, NO_2^- y NH_4^+ de la siguiente manera:

Nitritos (NO_2^-) – Nitratos (NO_3^-)

La determinación del nitrito se basa en el método de reducción de cadmio; donde la muestra pasa a través de una columna que contiene gránulos de cobre y cadmio que reduce el nitrato a nitrito. El nitrito es determinado por la diazotación con $C_6H_8N_2O_2S$ y acoplamiento con $C_{12}H_{16}Cl_2N_2$ para formar un azo de color, el cual absorbe luz a 540 nm.

Se tomaron 5 mL de la muestra del extracto de suelo y se colocaron en los recipientes del autoanalizador de flujo segmentado (Skalar, SANplus System, Breda). Se preparó una curva estándar con $NaNO_3$ en una concentración de 10, 20, 30, 40, 50 mg L^{-1} para la cuantificación de nitritos y nitratos.

Amonio (NH_4^+)

El procedimiento para la determinación del amonio está basado en la reacción modificada de Berthelot; en donde el NH_3 de la muestra es clorado a NH_2Cl, el cual reacciona con $C_8H_8O_3$ a 5-aminosalicilato. Posterior a la oxidación y al acoplamiento oxidativo se forma una muestra compleja de color verde. La absorción del complejo formado es medida a 660 nm. Se tomaron 5 mL de cada una de las muestras de los extractos de suelo y se colocaron en un autoanalizador de flujo segmentado (Skalar, SANplus System). Se preparó una curva estándar con NH_4Cl en una concentración de 2, 4, 6, 8, 10 mg L^{-1} para la cuantificación de amonio.

Nitrógeno total (NT)

La determinación de nitrógeno total se realizó por el método Kjendahl, que involucra una digestión ácida para convertir el N a NH_4^+ y posteriormente la determinación de NH_4^+.

El procedimiento involucró dos pasos: a) digestión de la muestra de suelo (1 g) para convertir el N a NH_4^+ y b) determinación de NH_4^+ en la digestión realizada del N. La digestión de la muestra se desarrolló por calentamiento de la muestra con ácido sulfúrico concentrado y K_2SO_4 que promovió la oxidación de la materia orgánica y la conversión del nitrógeno orgánico a NH_4^+. Después de la digestión, el NH_4^+es determinado por la titulación del NH_4^+liberado por destilación de la digestión con un álcali ($NaOH$-Na_2SO_4 0.05 N) (Mattigod y Zachara, 1996).

Fósforo disponible

La concentración de fósforo disponible se cuantificó mediante el método de Olsen (1954), en donde se pesaron 10 g de suelo y se agregaron 40 mL de solución extractora $NaHCO_3$ 0.5 M (1:20 p/v) a un pH de 8.5. La muestra se agitó en un agitador orbital (Orbital shaker, Modelo: TS-100) durante 40 minutos. Una vez agitada, se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos usando una centrifuga (Thermo Scientific MicroCL 17). Se tomaron 10 mL del sobrenadante de la muestra, a la que se le adicionó 1.6 mL del reactivo combinado (H_2SO_4 5 N, $C_4H_4KNaO_6$ 0.005 M, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 0.03 M y $C_6H_8O_6$ 0.1 M). Se leyó la absorbancia de la muestra a 882 nm después de 30 minutos y antes de 60 minutos (Olsen *et al*., 1954). La concentración de fósforo disponible fue calculada mediante la ecuación de la recta de una curva estándar con NaH_2PO_4 a diferentes concentraciones de fósforo (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg L^{-1}).

Fósforo total

El fósforo total se cuantificó mediante el método por digestión con agua regia (HCl concentrado y HNO_3 0.5 N). En el cual a 500 mg de suelo se le agregaron 10 mL de agua regia y se llevó a una digestión hasta sequedad. Al digestado se le agregaron 10 mL de HCl 0.5 N, se calentó en baño maría a 80 °C por 30 minutos, se dejó enfriar y se filtró. El filtrado se aforó a 25 mL con H_2O destilada. De esta solución se tomaron 10 mL y se le agregaron 1.6 mL del reactivo combinado (H_2SO_4 5 N, $C_4H_4KNaO_6$ 0.005 M, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 0.03 M y $C_6H_8O_6$ 0.1

M), se dejó desarrollar el color y finalmente se leyó su absorbancia a 880 nm. La concentración de fósforo disponible fue calculada mediante la ecuación de la recta de una curva estándar con KH_2PO_4 a diferentes concentraciones de fósforo (0, 2, 4, 6, 8, 10 µg P mL-1).

Fenoles

Se llevó a cabo la extracción de fenoles siguiendo la metodología de Muscolo *et al*., (2013) modificada para bajas concentraciones, en donde se pesaron 2 g de suelo, se colocaron en viales de 15 mL, se les adicionó 8 mL de agua destilada dejando en agitación constante durante 20 h aproximadamente. Posteriormente se tomó una muestras de 2 mL, se centrifugó durante 10 minutos a 5000 rpm (Thermo Scientific MicroCL 17).

Del sobrenadante se tomaron 100 µL y se le adicionaron 700 µL de agua destilada, 50 µL de reactivo Folin-Cioacolteu y se dejó en reposo durante 5 minutos. Posteriormente se agregaron 15 µL de Na_2CO_3 al 20%, dejándolo reposar en oscuridad durante 2 horas para el desarrollo de color. Finalizado este tiempo se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro Hach DR 2800. La concentración de fenoles totales fue calculada mediante la ecuación de la recta utilizando una curva estándar con ácido gálico a diferentes concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mg L^{-1}.

Vinazas

pH

Para las vinazas el pH se midió directamente de la muestra siguiendo la metodología propuesta en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (American Public Health Association *et al*., 1999), realizando el análisis por triplicado, en donde se sumerge el electrodo del potenciómetro en la muestra con ayuda de un potenciómetro (Hanna HI 3512), registrando la lectura después de que se estabilizó.

Conductividad eléctrica (CE)

La conductividad eléctrica de las muestras de vinazas se hizo directamente de la muestra siguiendo la metodología APHA (1990) y por triplicado, en donde se introdujo el electrodo del conductímetro (Hanna HI 3512) registrando la lectura después de que se estabilizó.

Fósforo disponible (fosfatos PO_4^{-3}):

El fósforo disponible en las vinazas fue determinado como ortofosfatos: se midió mediante el método de molibdato de las pruebas de Hach® con número 8048. El cual está basado en el método 365.2 de la USEPA y por el método 4500_P del Standard Methods (APHA, 1999). Se tomaron 5 mL de vinaza y se adicionaron al vial del kit de Hach (conteniendo H_2SO_4, molibdato de amonio y ácido ascórbico), se mezcló lentamente y se dejó reposar durante 7 minutos. El ortofosfato reaccionó con el molibdato en un medio ácido para producir una mezcla del complejo fosfato/molibdato. El ácido ascórbico redujo el complejo dando un color azul intenso de molibdeno. La absorbancia de las muestras se midió a 880 nm en un espectrofotómetro (Hach® DR 500) para determinar su concentración de ortofosfatos.

Nitritos (NO_2^-)

Para las vinazas la concentración de nitritos (NO_2^-) se midió mediante el método colorimétrico de $FeSO_4$ de las pruebas de Hanna® método HI 93708-01. De la vinaza se tomaron 10 mL y se les adicionó el reactivo HI 93708 [Sulfanilamida y N-(1-naftil) etilendiamina]. Ésta reacción produce un color café verdoso del cual fue registrada su absorbancia en un espectrofotómetro Hanna® (HI 83200) a 575 nm para obtener la concentración de nitritos.

Nitratos (NO_3^-)

La concentración de nitratos para las vinazas se midió mediante el método espectrofotométrico Hanna® adaptado del método de reducción de cadmio. Los nitratos se reducen a nitritos en presencia del cadmio. Los nitritos producidos de este modo reaccionan con el reactivo ácido fenildisulfónico (0.02 N) hasta producir un compuesto naranja. La cantidad de color desarrollado es proporcional a la concentración de nitrato presente en la muestra acuosa. Se tomaron 6 mL de la muestra y se adicionó el reactivo HI 93728-0® (ácido fenil disulfónico 0.02 N) se agitó y se dejó reposar por 5 minutos. La reacción entre el nitrato y el reactivo causa un color ámbar en la muestra, del cual se midió su absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro Hanna® (HI 83200) para determinar la concentración de NO_3^-.

Amonio (NH_4^+)

El amoníaco reacciona con el reactivo de Nessler en solución básica hasta formar un

compuesto amarillo. La absorbancia de este producto coloreado es proporcional a la concentración de nitrógeno amoniacal presente en la muestra acuosa. La reacción entre los 10 mL de la vinaza y los reactivos HI 93715A-0 (reactivo de dispersión alcohol polivinílico) y HI 93715B-0 (reactivo de Nessler) causan una coloración amarilla en la muestra, de la cual se leyó su absorbancia a 420 nm en el espectrofotómetro Hanna® (HI 83200) para determinar la concentración de amonio.

Nitrógeno total (NT)

La determinación de nitrógeno total por digestión involucró dos pasos: a) digestión de la muestra de vinaza (5 mL) para convertir el N a NH_4^+ y b) la determinación de NH_4^+ en la digestión realizada del N. La digestión de la muestra se desarrolló por calentamiento de la muestra con ácido sulfúrico concentrado y K_2SO_4 que promovió la oxidación de la materia orgánica y la conversión del nitrógeno orgánico a amonio. Después de la digestión, el amonio es determinado por la titulación del amonio liberado por destilación de la digestión con un álcali ($NaOH$-Na_2SO_4 0.05 N). Las muestras para el análisis de nitrógeno total se enviaron a la unidad de servicios analíticos y metrológicos (USAM) del CIATEJ para su determinación con la técnica antes descrita.

Demanda química de oxígeno total (DQO)

La demanda química de oxígeno (DQO) fue determinada en la muestra de vinazas mediante el método de digestión de reactor de las pruebas de Hach ®, donde la muestra de vinaza (1 mL) se calienta 2 h con dicromato de potasio (0.004 M) para su digestión. Los compuestos orgánicos oxidables reaccionan, reduciendo el ion de dicromato ($Cr_2O_7^{-2}$) a un ion crómico verde (Cr^{+3}) del cual se lee la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro Hach® para obtener la concentración de DQO. El reactivo DQO contiene iones de plata y de mercurio en donde la plata actúa como catalizador y el mercurio se utiliza para formar complejos de las interferencias de cloruros.

Demanda biológica de oxígeno total (DBO)

La demanda biológica de oxígeno (DBO) se calculó mediante el método de dilución 8043 de las pruebas de Hach ®. La DBO se realizó incubando una muestra de vinazas (100 mL) en un período estándar de cinco días y se determinó el cambio en el contenido de oxígeno disuelto

mediante un respirómetro DBO Trak II de Hach ®. El método se basa en medir la cantidad de oxígeno que requieren los microorganismos para efectuar la oxidación de la materia orgánica presente en aguas naturales y residuales, y se determina por la diferencia entre el oxígeno disuelto inicial y el oxígeno disuelto al cabo de cinco días de incubación a 20 °C.

Sólidos

Para el análisis de los sólidos en las vinazas se utilizaron las técnicas señaladas en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1999), donde se determinaron los sólidos totales, suspendidos, volátiles, disueltos y sedimentables. Para cada uno de ellos se aplicó el siguiente procedimiento general: Se registró el peso inicial de los contenedores a utilizar en la evaporación de las muestras, posteriormente estos contenedores (crisoles de porcelana o recipientes de evaporación) se llevaron a peso constante, generalmente sometiéndolos a temperaturas de 550 ºC durante una hora. Luego fueron colocados en un desecador hasta enfriarse y se tomó el peso final. La colocación en la mufla se realizó hasta obtener un peso constante de los recipientes. Posteriormente se llevó a cabo el procedimiento en específico para cada uno de los valores a determinar.

Sólidos totales

Se define como sólido total al material residual que queda en el recipiente después de evaporar el agua de la muestra de agua seleccionada y su subsecuente secado en estufa bajo una temperatura determinada que en este caso fue de 105 ºC durante 1 h. El contenido de sólidos totales es determinado utilizando la siguiente fórmula con los pesos registrados:

$$Sólidos\ totales \frac{mg}{L} = \frac{(A - B) * 1000}{Volumen\ de\ muestra\ (mL)}$$

Donde:

A= Peso del residuo secado + peso del crisol en mg

B= Peso del crisol en mg

Sólidos suspendidos totales

Se definen así a los sólidos que son retenidos en un filtro después de pasar la muestra de agua

a través del mismo, registrando los pesos antes y después del filtrado, los sólidos suspendidos totales se determinaron con la siguiente fórmula:

$$Sólidos\ suspendidos\ totales \frac{mg}{L} = \frac{(A - B) * 1000}{Volumen\ de\ muestra\ (mL)}$$

Donde:

A=Peso del residuo seco + peso del filtro de fibra de vidrio en mg

B= Peso del filtro de fibra de vidrio en mg

Sólidos disueltos totales

Es la porción de sólidos que pasan a través de un filtro de diámetro de poro ≤ 0.2 µm. Los sólidos totales disueltos se determinaron utilizando la siguiente fórmula:

$$Sólidos\ totales\ disueltos \frac{mg}{L} = \frac{(A - B) * 1000}{Volumen\ de\ muestra\ (mL)}$$

Donde:

A=Peso del residuo secado + peso de crisol en mg

B= Peso del crisol en mg

Sólidos volátiles

Se define así a la diferencia en peso después de la ignición de una muestra de agua a 550º C durante 1 h, la cual proviene de la determinación de sólidos totales después del secado de la muestra en estufa a 105 ºC durante 1 h. Donde se calculó su valor mediante la siguiente fórmula:

$$Sólidos\ volátiles \frac{mg}{L} = \frac{(A - B) * 1000}{Volumen\ de\ muestra\ (mL)}$$

Donde:

A= Peso del residuo + Peso del crisol antes de la ignición a 550ºC

B= Peso del residuo + Peso del crisol después de la ignición a 550ºC

Sólidos sedimentables

Se determinaron los sólidos sedimentables de la vinaza utilizando conos Imhoff, en donde se agitó la muestra para tener una distribución homogénea de los sólidos sedimentables. Se colocó 1 L de la muestra en un cono Imhoff y se dejó sedimentar durante 45 minutos. Posteriormente se agitaron ligeramente los lados del cono con un agitador, se dejó reposar durante 15 minutos más y se registró el volumen de los sólidos sedimentables en el cono.

Materia orgánica (MO)

El contenido de materia orgánica se obtuvo a través de la calcinación de sólidos totales de la muestra, a 550 ºC durante 1 h, registrando el peso de las cenizas residuales y utilizando la siguiente fórmula de acuerdo con NMX-FF-109-SCFI-2008:

$$\%\ Materia\ org\acute{a}nica\ (M.O.)\ = 100\% - \%\ Ceniza$$

Carbono orgánico (CO)

Se determinó con la siguiente fórmula:

$$\%\ Carbono\ org\acute{a}nico\ total\ = \frac{\%\ M.O.}{1.724} * 100$$

Donde:

% CO = Porcentaje de carbono orgánico

% MO = Materia orgánica calculada a partir del % de cenizas

1.724 = Factor Van Benmelen

<u>Fenoles</u>

La determinación de fenoles totales en vinaza se realizó mediante el método Folin-Cioacolteu, en el cual la vinaza es diluida con agua destilada en una proporción 2:1 v/v, posteriormente es centrifugada durante 15 minutos a 3500 rpm (Thermo Scientific MicroCL 17). El sobrenadante es filtrado en papel filtro de 0.45 µm de diámetro de poro. Se tomaron 40 µL de solución por triplicado y se colocaron en tubos para espectrofotómetro, se adicionaron 3.16

mL de agua destilada, 200 µL de reactivo Folin y se dejó reposar durante 5 minutos. Posteriormente se adicionó 600 µL de solución de Na_2CO_3 al 20%, y se dejó reposar en oscuridad total durante 2 horas. Finalmente se leyeron las absorbancias de las muestras en un espectrofotómetro (xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer) a una longitud de onda de 765 nm. La concentración de fenoles totales fue calculada mediante la ecuación de la recta de una curva estándar con ácido gálico a diferentes concentraciones (300, 400, 500, 600, 700 y 800 ppm).

Metales pesados

Se llevó a cabo el análisis de metales pesado en las vinazas siguiendo la metodología propuesta por USEPA 6010B que involucra la digestión de la muestra con HNO_3 y H_2O_2 seguido por una dilución con HNO_3 o HCl. Para realizar la medición de los metales de interés mediante un espectrómetro de emisión atómica inductivamente acoplado a plasma (ICP-OES), esto fue realizado por la Unidad de Servicios Analíticos y Metrológicos del CIATEJ.

Determinación de cationes

Se llevó a cabo el análisis de cationes en las vinazas siguiendo la metodología propuesta por EPA 6010B/EPA 3050 para cationes (Ca^{++}, Mg^{++}, Na^{+} y K^{+}) a través de espectrometría de emisión atómica de plasma acoplada inductivamente (ICP-AES por sus siglas en inglés), esto realizado por la Unidad de Servicios Analíticos y Metrológicos de CIATEJ.

MICORRIZAS

Extracción e identificación inicial de esporas de HMA del suelo.

Se tomaron 90 g de suelo para la extracción, la cuantificación y la identificación de esporas de HMA siguiendo el método de tamizado húmedo y decantación con centrifugación en sacarosa al 50% (p/v) (Brundrett *et al*., 1994). Las esporas obtenidas fueron clasificadas e identificadas 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.

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 comparon 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, Polonia, Prof. Janusz Blaszkowski (http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/) y AMF-Phylogeny (http://www.amf-phylogeny.com/) del Prof. Arthur Schüßler, Universidad Ludwig-Maximilians de Munich, Alemania.

Cálculo de la abundancia relativa de esporas de las especies de HMA.

La abundancia relativa de esporas de cada especie se calculó a partir de la información obtenida de 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 es el número de individuos totales en la muestra.

Evaluación de la germinación de semillas de maíz a diferentes concentraciones de vinaza *in vitro*

Debido a que 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. Se realizó un ensayo *in vitro* en maíz para evaluar los efectos de la vinaza a diferentes concentraciones en la germinación de esta planta.

Se utilizaron 5 semillas de maíz elotero (*Zea mays L.*) hibrido A-7573 por cada caja Petri, colocándolas sobre papel filtro esterilizado y humedecido con 10 mL de vinazas a diferentes concentraciones 25%, 50%, 75% y 100% o con agua destilada estéril como control (n=10). Las cajas Petri se llevaron a incubación en oscuridad durante 10 días a 28 °C. Se registró la germinación a los días 4, 6, 8 y 10 días, al final se midió la longitud de la radícula y del hipocótilo.

ETAPA II

Preparación y desarrollo del experimento en invernadero

Para evaluar el efecto de las vinazas sobre el cultivo de maíz se estableció un cultivo en invernadero, el cual se preparó como se describe a continuación:

Pre-germinación de semillas

Se utilizaron semillas de maíz elotero (*Zea mays L.*) hibrido A-7573. Las semillas de maíz se pre-germinaron papel sanitario estéril y humedecido con agua estéril durante 8 días en incubación a 28 ºC. En total se realizó la pre-germinación de aproximadamente 400 semillas. Después de este tiempo cuando las semillas habían germinado y el hipocótilo tenía de 2 cm de longitud en promedio, fueron sembradas en bolsas de polietileno para establecer el experimento en invernadero y fueron sembradas en macetas.

Establecimiento del experimento en invernadero

Se llevó a cabo el experimento en invernadero utilizando bolsas de polietileno (50 x 16 cm – capacidad 7 Kg) con 5 kg suelo, cuyo contenido de HMA y propiedades fisicoquímicas fueron previamente caracterizados y con una n=6, en donde se aplicaron diferentes dosis de vinazas (25%, 50% y 75%) y una fertilización mínima utilizando el fertilizante comercial Triple 17 (0% y 17% de NPK). Se utilizaron las plántulas de maíz previamente germinadas, las cuales fueron colocadas en las bolsas de polietileno y de acuerdo a cada tratamiento de dosis de vinazas, fertilización y control (riego con agua). Se tuvieron los mismos tratamientos pero sin la adición de fertilizante (Figura 6). A los tratamientos con fertilización se les suministró una dosis de 15 Kg N ha^{-1} de fertilizante Triple 17 (N 17%, P_2O_5 17% y K_2O 17%) dividida en dos tiempos: una al inicio del experimento y otra al inicio de la etapa de floración del maíz, esto

para que la planta recibiera nutrientes externos al suelo y las vinazas en las etapas críticas de crecimiento. Los tratamientos fueron establecidos con las siguientes claves: V25, V50, V75 y W para tratamientos sin fertilizante y con riego de vinaza al 25%, 50%, 75% y agua respectivamente. Las claves para los tratamientos con fertilizante fueron: VF25, VF50, VF75 y WF en el mismo orden.

Adicionalmente se estableció otro lote de plántulas de maíz germinadas a las mismas condiciones para determinar biomasa (peso seco) al día cero (después de un mes de establecimiento) con n=3.

Las macetas con las plántulas sembradas se dejaron 1 mes para permitir su establecimiento y promover la simbiosis con los HMA; durante este tiempo fueron regadas con agua. Posterior a esto, las macetas fueron regadas con agua o vinaza según correspondía al tratamiento de prueba para mantener la humedad a requerimiento de la planta, en promedio dos riegos semanales. Al inicio del riego con vinaza fue el tiempo cero de experimentación. La altura de las plantas fue tomada como la inicial en el día cero. El cultivo se mantuvo en invernadero durante cuatro meses en total (un mes de aclimatación y tres meses de experimentación); cada siete días se midieron índice de clorofila (las unidades CCI son el valor relativo de clorofila, se calcula como el porcentaje de transmitancia a 931 nm/ % de transmitancia a 653 nm.) con un medidor portátil BioScience CCM200 (Manufactured por CID, Inc. model CI-202), el número de hojas y la altura. La medición de altura de la planta se realizó desde la base del tallo al ápice con un flexómetro.

Al finalizar el experimento, se determinó la biomasa total tomando la raíz y la parte aérea de la planta. Esto se realizó por medio del peso seco de la planta, obtenido después de secar el material vegetal en estufa tres días a 60°C. El número de hojas se contabilizó tomando sólo en consideración las hojas que se encontrarán desenrolladas totalmente y en buenas condiciones visuales, evitando contabilizar hojas jóvenes y adultas en marchitez.

Figura 6. Experimento instalado en el invernadero 1 mes después del trasplante previa germinación *in vitro*.

Evaluación de la eficiencia fotoquímica de la planta de maíz durante el experimento

Para determinar algún cambio en la eficiencia fotoquímica de las hojas del maíz, se midió la fluorescencia de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos, se seleccionaron 3 plantas aleatoriamente de cada tratamiento para realizar mediciones en esas mismas plantas durante todo el experimento. Se utilizó un láser de He-Ne a 632 nm con una potencia de salida eficaz de 3Mw utilizado como fuente de excitación. Una área de 10 mm de diámetro de la superficie del envés de la hoja fue irradiada con el láser; la fluorescencia emitida por la región irradiada fue capturada por una fibra óptica bifurcada con un núcleo de 400 micras de diámetro que se acopla al láser y fue conectada a un espectrofotómetro SF 200 (Ocean Optics Inc.). La abertura de entrada de la fibra fue colocada a 15 mm de la hoja y se dirigió al centro de la zona de iluminación. La recolección de datos y el procesamiento de espectros y análisis se llevaron a cabo en tiempo real con un microordenador y el software disponible en el mercado OOI Base (Ocean Optics Inc.); esta medición se llevó a cabo una vez por mes (Cervantes-Martinez *et al.*, 2004).

La evaluación de la eficiencia fotoquímica a partir de la fluorescencia en las plantas fue seleccionada para el estudio, debido a que los procesos fotosintéticos en plantas son altamente sensibles a estreses ambientales, sin embargo, los estudios convencionales sobre fotosíntesis en donde se utiliza el intercambio de gases son usualmente destructivos sobre la planta, tardado y proporciona un diagnóstico insuficiente sobre el disturbio sobre el sistema fotosintético (Lüdeker *et al*, 1999). La medición de la fluorescencia puede dar una buena, rápida, y no invasiva medición de los cambios en una muestra particular (Maxwell *et al.*, 2000). Por lo que se ha utilizado esta herramienta para el estudio de los procesos fotosintéticos en las plantas, con la finalidad de conocer el estado fisiológico de la planta y determinar su condición de manera no invasiva. Esta medición está fundamentada en que la fluorescencia de clorofila da información sobre el estado del fotosistema II (PSII por sus siglas en ingles), indicando hasta qué punto PSII está utilizando la energía absorbida por la clorofila y en la medida en que esté siendo dañada por el exceso de luz. Fisiológicamente hablando indica cómo se da el flujo de electrones durante la fotosíntesis, así mismo, el PSII es el más sensible a daños, siendo el primer indicador de estrés en la planta (González Moreno *et al*., 2008).

Cuando una hoja verde es excitada por la luz UV, hay dos tipos de emisiones de fluorescencia: azul-verde (430-530 nm), roja (680 nm), roja lejana (740 nm), siendo los picos alrededor de 690 y 735 nm de interés debido a que permiten saber el estado en el que se encuentra la clorofila, y por tanto el funcionamiento de los fotosistemas de la planta (Zao *et al*, 2016). La fluorescencia medida en los picos corresponde a la emisión de energía de la luz que no es absorbida por los pigmentos fotosintéticos (clorofila o carotenoides) para la fotosíntesis. La fluorescencia de la clorofila esta inversamente relacionada con la tasa de fotosíntesis. Bajo condiciones óptimas de fotosíntesis, la disipación de energía luminosa absorbida a través de la fluorescencia de la clorofila es baja. Cuando el proceso global de fotosíntesis se altera en las reacciones de luz o de oscuridad, las emisiones de fluorescencia aumentan y varios parámetros de fluorescencia de clorofila cambian sus características (González Moreno *et al*., 2008). De tal manera que en este estudio se consideró la pertinencia de evaluar la eficiencia fotoquímica por medio de la fluorescencia de la clorofila.

Análisis del suelo y de la planta del maíz después del experimento

Después de tres meses de experimentación en invernadero las plantas fueron extraídas de las macetas, separando el suelo para determinar la biomasa total (peso seco de raíz, tallo y hojas) al tiempo final. Se tomaron muestras de suelo de cada tratamiento para el análisis de carbono orgánico, nitrógeno inorgánico, fósforo disponible, pH y CE por los métodos descritos anteriormente.

Determinación del porcentaje de colonización por HMA en las raíces de las plantas

Se determinó el porcentaje de colonización por HMA en las raíces de las plantas para cada dosis de vinazas y en las plantas con riego con agua como control, en raíces delgadas (<1 mm). Se clarearon por la metodología de Phillips y Hayman (1970) (H_2O – KOH 10% 30 min 50°C – H_2O – H_2O_2 5% 30 min 50°C – H_2O – HCl 10% 10 min), y se tiñeron con azul de tripano al 0.01% en lactoglicerol. Se observaron aproximadamente 60 campos por muestra en un microscopio óptico (Olympus BH-2) para determinar la colonización total por el método ligeramente modificado de McGonigle *et al*. (1990) ligeramente 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:

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

Las estructuras que se consideraron para el porcentaje de colonización en la raíz son las esporas de HMA, hifas (aseptadas), arbúsculos 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.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron evaluados a través de un análisis de varianza (ANOVA), siempre y cuando estos cumplieran con los criterios de normalidad, para encontrar las diferencias significativas entre las medias de cada tratamiento mediante una prueba de Tukey. Cuando no fueron normales, los datos se normalizaron utilizando logaritmo para realizar comparaciones entre tratamientos, tiempo, y condición de fertilización o no. Todas las variables medidas al tiempo 0 y final fueron sometidas a un análisis de componentes principales (ACP) para evaluar alguna correlación. Se utilizó el software STATGRAPHICS® Centurion XVI.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PRE-EXPERIMENTACIÓN

Caracterización de las vinazas

La caracterización de las vinazas se presenta en la tabla 3. Éstas muestran un pH ácido, de 3. 9 a 4.24, lo cual sugiere que no existe un tratamiento adecuado antes de su disposición. La norma EPA/625/R-04/108 recomienda un pH de 6 a 8 en el agua de riego para evitar un efecto negativo a los cultivos, principalmente en relación a la toxicidad por metales como aluminio, este precipita en un pH de 5.5 a 8.0, pero a un pH menor es tóxico (Rowe y Adbel-Magid,1995).

Al comparar los resultados obtenidos de DQO (40,433–57,246 mg L^{-1}), DBO (13,500–40,005 mg L^{-1}), sólidos sedimentables (1.8-5.3 mL L^{-1}), sólidos suspendidos totales (6,000-14,027 mg L^{-1}) se encontró que todos los valores estuvieron por arriba de los límites máximos permisibles para su descarga en cuerpos de agua establecidos por la NOM-001-SEMARNAT-1996 (Tabla 2. Límites máximos permisibles para contaminantes básicos. Suelos. Uso en Riego agrícola), y no se encuentran especificados para su uso en riego agrícola de esta normatividad ni dentro de la normatividad de los Estados Unidos EPA/625/R-04/108 (USEPA, 2004) (Table 2-7. Recommended Limits for Constituents in Reclaimed Water for Irrigation), que define los límites máximos permisibles de diferentes parámetros en agua para riego a suelos agrícolas (Tabla 3).

La única normatividad existente para la aplicación de vinazas en suelo es la Norma Técnica P4.231, que establece los criterios y procedimientos para la aplicación de vinazas de la industria alcoholera en suelo agrícola en Brasil. Esta normativa indica que sólo se podrán aplicar al suelo alrededor de 185 kg de K_2O anualmente, y en donde los acuíferos estén a 1.5 metros de distancia.

Al comparar estos resultados de caracterización de las vinazas del tequila con los reportados

por otros autores se encontró que parámetros como DBO y DQO, son menores a los reportados por López-López *et al*, (2010), teniendo un rango de 60 a 100 g L^{-1} de DQO y de 35 a 60 g L^{-1} de DBO mientras que están dentro de los reportado por Buitrón y Carvajal (2010) quienes reportaron una concentración de 29.9 a 30.5 g L^{-1} y 19.8 a 20.9 g L^{-1} 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.

España-Gamboa (2011), reportó para vinazas tequileras valores de pH de 3.4, DBO de 20,600 mg L^{-1}, DQO de 55,200-66,300 mg L^{-1}, ST 780-880 mg L^{-1}, mientras que Retes-Pruneda *et al.*, (2014) reportaron valores de pH ácidos (3.9), DQO de 60,000-100,000 mg L^{-1}, DBO de 40,000 a 60,000 mg L^{-1}. Estos valores indicaron que la vinaza que se caracterizó en este trabajo se encontró dentro del intervalo de valores reportados por otros autores para éstos parámetros.

La vinaza tuvo una alta concentración de cationes como calcio (Ca^{++}) (hasta 1322 mg L^{-1}), potasio (K^{+}) (366 mg L^{-1}), magnesio (Mg^{++}) (231.8 mg L^{-1}) y sodio (Na^{+}) (49.6 mg L^{-1}). Estas altas concentraciones de sales han sido reportadas por otros autores como Retes-Pruneda *et al*., (2014), quienes encontraron 226 mg L^{-1} de Ca, 104 mg L^{-1} de Mg y López-López *et al*., (2010) quienes reportaron 200-1000 mg L^{-1} de Ca, 100-300 mg L^{-1} de Mg y 150-650 mg L^{-1} de K. La salinidad se considera que es uno de los mayores riesgos al utilizar la vinaza en composta o para riego (Fuess y Garcia, 2014).

Respecto al contenido de fósforo, se encontró una alta concentración de fósforo disponible (67.6 – 326.7 mg L^{-1}) en las vinazas. López-López *et al*., (2010) reportaron valores mayores (100-700 mg L^{-1}) y un contenido de nitrógeno total menor (20-50 mg L^{-1}) a lo reportado en este trabajo (140.55 – 586.67 mg L^{-1}). Por otra parte, se observó que la vinaza tenía una alta concentración de amonio (456.3 ± 8.4 mg L^{-1}) en comparación con los nitritos (3.7 ± 0.6 mg L^{-1}) 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^{-1}), nitrógeno total y sólidos sedimentables (1.8 – 5.3 mL L^{-1}) fue mayor a lo permitido para descarga a ríos para uso agrícola (NOM-001).

El contenido de fenoles en las vinazas fue de 320.7–1,052.7 mg L^{-1} medidos como fenoles totales equivalentes a ácido gálico (Tabla 3), lo cual fue mucho mayor a los valores reportados en vinazas de tequila por Buitrón y Carvajal (2010) de 44-81 mg L^{-1}, y al de Retes –Pruneda *et al.,* (2014) de 153 mg L^{-1}.Las diferencias en los compuestos fenólicos podrían estar dadas por la etapa de maduración del agave y el proceso de cocción y destilación con el que se lleva a cabo la producción del tequila, 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 que se pudieran generar algunas inconsistencias. Con respecto a la madurez de las plantas Almaraz-Abarca et al., 2009 reportaron diferencias en el contenido fenólico en el tejido foliar entre plantas jóvenes y adultas de *Agave durangensis.* La NOM-001-SEMARNAT y la USEPA no regulan el contenido de fenoles en descargas de aguas para uso en suelos agrícolas.

Por otra parte, la identificación de los compuestos fenólicos presentes en las vinazas utilizadas en este experimento se analizaron por cromatografía en otro trabajo (Rodríguez-Félix *et al.*, 2016) y se encontraron ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido caféico, vainillina, 2,4-di-terbutilfenol, siringaldehído y quercitina. Algunos autores indican que los fenoles en suelo pueden ser inhibidores o tóxicos para las plantas y los HMA, disminuyendo su presencia en plantas como sorgo y trébol (Leadir L. *et al.,* 1997; Morandi, 1996).

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 respecto al mosto fermentado. Esto indica que la mayor parte de estos compuestos se forman en esta etapa.

Por otro lado, el contenido de metales en las vinazas tequileras, como arsénico, cadmio, cobre, cromo, mercurio, plomo, níquel y zinc estuvieron dentro de los límites máximos permisibles para su aplicación a suelos agrícolas de acuerdo con la NOM-001-SEMARNAT-1996, y estuvieron por arriba del límite marcado por la EPA para cobre y hierro (4 mg L^{-1}, 32 mg L^{-1} respectivamente). De acuerdo con Prado (2015), en el tequila se puede encontrar una

concentración alta de cobre debido al proceso de corrosión del equipo de destilación que puede llegar hasta 10 mg L^{-1} cuando el sistema ha estado fuera de operación unos días. Por lo tanto, también la vinaza contiene parte de este cobre (Cu), cuya concentración 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 a la registrada en otros trabajos 14 mg $L.^{-1}$ (Retes-Pruneda *et al*., 2014) ó 35.2 – 45 mg L^{-1} (España-Gamboa *et al*., 2011) para otras fuentes de vinaza como alcoholera 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).

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica de las vinazas tequileras y su comparación con las regulaciones mexicanas y americanas del medio ambiente.

Parámetro	Vinazas tequileras	NOM-001-SEMARNAT-1996†	EPA/625/R-04/108†
pH	3.49-4.24 ± 0.01-0.08	N.E.	6
Conductividad eléctrica (CE) (mS cm^{-1})	2.46-3.5 ± 0-0.1	N.E.	N.E.
Fósforo disponible (PO_4^{-3}) (mg L^{-1})	67.6-326.7 ± 0.8-30.6	N.E.	N.E.
Fósforo total (PT) (mg L^{-1})	10.23-69.1 ± 1.9-2.03	N.E.	N.E.
Materia orgánica (MO) (%)	2.2-3.9 ± 0.0-0.2	N.E.	N.E.
Nitritos (NO_2^-) (mg L^{-1})	3.7 ± 0.6	N.E.	N.E.
Nitratos (NO_3^-) (mg L^{-1})	<0.0 ± 0	N.E.	N.E.
Amonio (NH_4^+) (mg L^{-1})	456.3 ± 8.4	N.E.	N.E.
Nitrógeno total (NT) (mg L^{-1})	140.55-586.67 ± 4.55-11.55	N.E.	N.E.
Demanda química de oxígeno (DQO) (mg L^{-1})	40,433-57,246 ± 846-2148	N.E.	N.E.
Demanda biológica de oxígeno (DBO) (mg L^{-1})	13,500-40,005 ± 458-3,481	N.E.	N.E.
Sólidos totales (mg L^{-1})	28,000-133,833 ± 577-1,485	N.E.	N.E.
Sólidos suspendidos totales (mg L^{-1})	6,000-14,027 ± 500-852	N.E.	N.E.
Sólidos suspendidos volátiles (mg L^{-1})	11,000-12,333 ± 890-2000	N.E.	N.E.
Sólidos volátiles totales (mg L^{-1})	38,800-119,683 ± 1,353-1,800	N.E.	N.E.
Sólidos disueltos totales (mg L^{-1})	12,300-119,807 ± 2,211-2,500	N.E.	500-2000
Sólidos sedimentables (mL L^{-1})	1.8-5.3 ± 0.3-0.7	N.E.	N.E.
Litio (Li^+) (mg L^{-1})	0.036 ± 0.036	N.E.	N.E.
Sodio (Na^+) (mg L^{-1})	33.05 ± 22.71	N.E.	N.E.
Potasio (K^+) (mg L-1)	351.85 ± 20.01	N.E.	N.E.
Calcio (Ca^{++}) (mg L^{-1})	865.85 ± 645.09	N.E.	N.E.
Magnesio (Mg^{++}) (mg L-1)	202.05 ± 42.07	N.E.	N.E.
Fenoles (mg L^{-1})	320.7-1,052.7 ± 0.0-41.6	N.E.	N.E.
Arsénico (As) (mg L^{-1})	<1.0 ± 0	0.4	0.1
Cadmio (Cd) (mg L^{-1})	<0.3 ± 0	0.1	0.01
Cobre (Cu) (mg L^{-1})	4 ± 1.3	6	0.2
Cromo (Cr) (mg L^{-1})	<1.0 ± 0	1	0.1
Mercurio (Hg) (mg L^{-1})	<0.1 ± 0	0.01	N.E.
Plomo (Pb) (mg L^{-1})	<1.0 ± 0	10	5
Niquel (Ni) (mg L^{-1})	<1.0 ± 0	4	0.2
Zinc (Zn) (mg L^{-1})	1.6 ± 0	20	2
Hierro (Fe) (mg L^{-1})	32 ± 6.3	N.E.	5

N.E. significa no especificado; *Intervalo de 2 diferentes lotes de producción de vinaza; §Límites permisibles para descarga a ríos para uso de riego agrícola; n=3.

Caracterización de suelo

Los resultados de la caracterización del suelo se muestran en la tabla 4. De acuerdo a INEGI (2010) el suelo está clasificado como feozem, presentó 75% de arena, 14% de arcilla y 11% de limo, por lo cual con base en el triángulo textural se clasificó como de textura franco arenosa. Tuvo un pH de 5.83 ± 0.34, clasificado como moderadamente ácido de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000 y a la USDA (2014).

Presentó una conductividad eléctrica (CE) de 0.223 ± 0.065 mS cm^{-1}, con efectos despreciables de salinidad y no salino de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000 y la USDA (2014) respectivamente. Tuvo una capacidad de intercambio catiónico (CIC) de 9.4 ± 1.3 Cmol kg^{-1}, clasificada como baja en la NOM, pero no se reporta en la USDA (2014).

El suelo tuvo una concentración de fósforo disponible de 29.62 ± 10.56 mg kg^{-1} y de fósforo total de 42.7 ± 44.6 mg kg-1, por lo que puede ser clasificado como alto dentro de la NOM-021-RECNAT-2000 para concentración de fosfatos; los niveles de fósforo total no están especificados en ambas normativas. En materia orgánica el suelo tuvo un valor de 71.67 ± 0.0 g kg^{-1}, clasificado como de muy alta concentración y bajo contenido de nitrógeno total (NT) (988.3±149.7 mg kg^{-1}) de acuerdo con lo establecido por la NOM-021-RECNAT-2000; no registrado un valor en la clasificación de la USDA (2014).

De acuerdo con Zhang *et al.,* (2004) los suelos en donde se cultiva caña presentan un pH ácido, materia orgánica alta, NT bajo y fósforo disponible alto, lo cual coincide con el suelo muestreado para el proyecto. De acuerdo con la FAO (2014) los suelos clasificados como feozem son suelos de textura franca, fértil, con elevada capacidad de retención de agua y pH que van desde 5-5.8, propiedades que concuerdan con los obtenidos para el tipo de suelo utilizado.

Los niveles de plomo y cadmio se clasificaron como normales, y como adecuados para hierro, manganeso, zinc y cobre, con respecto a lo establecido en la NOM-021-SEMARNAT-2000; mientras que en la USDA (2014) no están especificados.

Los fenoles en el suelo presentaron obteniendo valores de 7.4 mg kg^{-1}, parámetro que no se encuentra registrado en la normatividad de México (NOM-021-SEMARNAT-2000) ni en la de Estados Unidos (USDA 2014).

También destaca una capacidad de intercambio catiónico de 8.3 Cmol kg^{-1} 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 a la NOM-021 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^2.

Tabla 4 .Caracterización de suelo y su comparación con regulaciones mexicanas y americanas.

Parámetro	Suelo	NOM-021-SEMARNAT-2000 (México)	USDA 2014 (USA)
Clasificación textural	Franco arenoso	Ca	N.R.
Tipo de suelo	Feozem	N.R.	N.R.
pH	5.83 ± 0.34	Moderadamente ácido	Moderadamente ácido
Conductividad eléctrica (CE) (mS cm^{-1})	0.223 ± 0.065	Efectos despreciables de salinidad	No salino
Capacidad de retención de agua (CRA) (%)	81.11 ± 4.75	N.R.	N.R.
Humedad (%)	6.52 ± 2.04	N.R.	N.R.
Capacidad de intercambio catiónico (CIC) (Cmol kg^{-1})	9.4 ± 1.3	Baja	N.R.
Cenizas (%)	92.83 ±0.00	N.R.	N.R.
Arena (%)	75.75 ± 2.54	N.R.	N.R.
Arcilla (%)	13.59 ± 1.22	N.R.	N.R.
Limo (%)	10.66 ± 2.16	N.R.	N.R.
Fósforo disponible (PO_4^{-3}) (mg kg^{-1})	29.62 ± 10.56	Alto	N.R.
Fósforo Total (PT) (mg kg^{-1})	42.7 ±44.6	N.R.	N.R.
Carbono orgánico total (COT) (g C kg^{-1})	41.57 ± 0.00	N.R.	N.R.
Materia orgánica (MO) (g kg^{-1})	71.67 ± 0.00	Muy alto	N.R.
Nitrógeno total (NT) (mg kg^{-1})	988.3±149.7	Bajo	N.R.
Plomo (Pb) (mg kg^{-1})	12.16 ± 0.84	Normal	N.R.
Cadmio (Cd) (mg kg^{-1})	< 0.25	Normal	N.R.
Hierro (Fe) (g kg^{-1})	10.977±0.125	Adecuado	N.R.
Manganeso (Mn) (mg kg^{-1})	428.9 ± 61.0	Adecuado	N.R.
Zinc (Zn) (mg kg^{-1})	35.75 ± 2.12	Adecuado	N.R.
Cobre (Cu) (mg kg^{-1})	11.12 ± 3.76	Adecuado	N.R.
Fenoles (mg kg^{-1})	7.40 ± 1.88	N.R.	N.R.

N.R.: No reportado; n=9

Densidad inicial de esporas de HMA en el suelo pre-experimentación

La cantidad de esporas obtenidas del suelo de estudio tuvo un promedio inicial de 83 esporas por cada 10 gramos. No hubo diferencias significativas al comparar los tres suelos en que fue dividido el campo de estudio (los datos no se muestran), esto indicó que se tuvo representatividad y que fue homogénea la cantidad de esporas de HMA que se puedo encontrar en el sitio. Pereira *et al.* (2014) reportaron de 93 a 131 esporas en 10 g de suelos agrícolas donde se cultiva caña de azúcar y donde se aplican prácticas de riego con vinazas de la industria alcoholera. A su vez, Nazim G. *et al.,* (2008) reportaron de 100-200 esporas en 10 g de suelos con cultivo de caña de azúcar sin riego de vinazas. Con base en lo anterior puede decirse que la densidad de esporas encontrada en este trabajo para suelos de cultivo de caña estuvo dentro de los intervalos reportados previamente.

Germinación de semillas de maíz a diferentes concentraciones de vinaza *in vitro*

En los ensayos de germinación de semillas de maíz con diferentes concentraciones de vinazas para evaluar su efecto sobre la germinación, se encontró que todas las concentraciones probadas (25, 50 y 75%) de vinazas inhibieron el proceso de germinación es decir sólo germinaron entre 16%-20% de las semillas (Figura 7). No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de vinazas evaluadas en el proceso de germinación desde 25% hasta 100% de vinaza. Esto indicó que a más de 25% de vinaza el efecto es negativo en la germinación. El porcentaje de germinación fue significativamente ($p<0.05$) reducido (30% de reducción) con las concentraciones de vinaza con respecto al control con agua (0% de vinaza). Y este efecto fue mayor y directamente proporcional al aumento de la concentración de vinazas.

Está reportado que el maíz tiene un tiempo de germinación de 3-4 días (Nicasio-Arzeta *et al.,* 2011). En la evaluación se observó que el mayor porcentaje de semillas germinó entre 4 y 6 días y que posteriormente no hubo cambio. No se encontraron diferencias significativas con respecto al tiempo en la germinación.

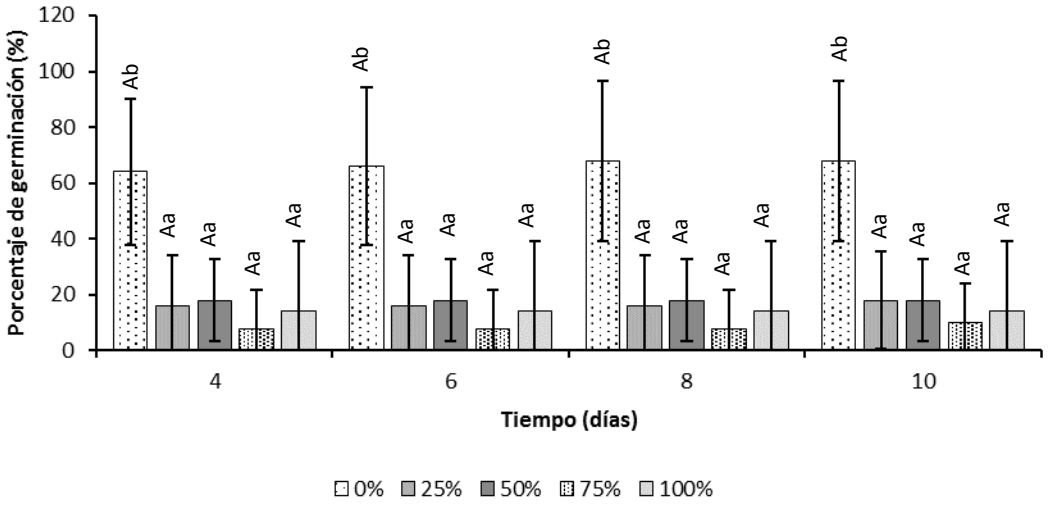

Figura 7 . Porcentaje de germinación de las semillas de maíz durante el tiempo con la aplicación de diferentes tratamientos de vinazas (0%, 25%, 50%, 75% y 100%). Letras mayúsculas diferentes muestran que existen diferencias significativas ($p<0.05$) en el tratamiento durante el tiempo. Letras minúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos en un mismo tiempo.

La inhibición de la germinación de semillas de diferentes cultivos por efecto del riego con vinazas de otras fuentes (alcoholeras) ya fue observada por otros autores. González *et al*., (2014) encontraron que la aplicación de vinazas alcoholeras al 100% produce una inhibición en la germinación de semillas de soya (*Glycine max*) de 2%, trigo (*Triticum aestivum*) de 1% y quinoa (*Chenopodium quinoa*) de 4%. Pero a medida que se disminuyó la concentración de vinaza y se ajustó el pH a 7, existió un mayor porcentaje de germinación, aunque el alargamiento radicular siguió siendo reducido (40 %) respecto al control. Mientras que Ale *et al.,* (2008) y Doke *et al.,* (2011) también encontraron una disminución de 50% y 46% en el porcentaje de germinación de arroz (*Oriza sativa*), trigo (*Triticum aestivum)* y sorgo (*Sorghum cernum*), al aumentar las concentraciones de vinazas alcoholeras con 5440 mg L^{-1} de K^{+} y hasta 720 mg L^{-1} de SDT respectivamente.

Ramana *et al.,* (2002) encontraron una inhibición en la germinación de las semillas de jitomate (*Solamun lycopersicum L*.), calabaza (*Cucurbita máxima*), pepino (*Cucumis sativus*) y cebolla (*Allium cepa*) con la aplicación de vinazas de la industria alcoholera (entre 1-25%). A su vez,

Pereira *et al*., (1992) encontraron que las semillas de maíz que eran sometidas a diferentes concentraciones (0, 100, 200 m^3 Ha^{-1}) de vinazas alcoholeras, disminuyeron su vigor y aumentó su tiempo de germinación.

Para el caso de vinazas de la industria del tequila solo existe un reporte, Nalleli (2004) reportó la inhibición (20%) de la germinación de semillas de tomate (*Solamun lycopersicum L*.) con composta de bagazo de agave que fue regada con vinazas de tequila durante el proceso.

La disminución de la germinación reportada por todos estos autores (Ale *et al*., 2008; Doke *et al*., 2011; Pandey *et al*., 2008; Ramana *et al*., 2002), los cuales atribuyen la inhibición a la germinación al alto contenido de sales, la acidez, o una acumulación de metales pesados. En las vinazas utilizadas se tuvieron todas estas características que pueden contribuir para afectar a la germinación de semillas, tales como una alta concentración de Na^+ (17.4 mg L^{-1}), K^+ (366.0 mg L^{-1}), Ca^{++} (1322.0 mg L^{-1}) y Mg^{++} (231.8 mg L^{-1}), una concentración de sólidos disueltos totales (SDT) de 12.3 g/L y un pH de 3.7. Después de observar que la germinación sí fue afectada por las vinazas en todas las concentraciones probadas, se consideró realizar la pre-germinación de las semillas de maíz con agua y hacer el trasplante de las plántulas al contar con un hipocótilo y radícula de 10 días de desarrollo aproximadamente, para el experimento en invernadero.

Crecimiento de radícula e hipocótilo

En la figura 8 se puede observar que la longitud de la radícula tuvo una disminución significativa con la aplicación de vinazas en las diferentes concentraciones de vinaza (25%, 50%, 75% y 100%) con respecto al control con agua (0%) ($p < 0.05$). No existió diferencia significativa en la longitud de la radícula e hipocótilo de maíz con las diferentes concentraciones de vinaza evaluadas (25%, 50%, 75% y 100%). Esto indicó que las vinazas afectaron el crecimiento radicular y del hipocótilo de maíz después de la germinación, posiblemente por la cantidad de sales que contienen (33.05 mg L^{-1} de Na, 351.85 mg L^{-1} de K, 865.85 mg L^{-1} de Ca y 202.05 mg kg^{-1} de Mg), dado que existen reportes para maíz acerca de que el estrés por salinidad en maíz reduce el crecimiento de brotes en un 50% (Rios-Gonzalez *et al*., 2002).

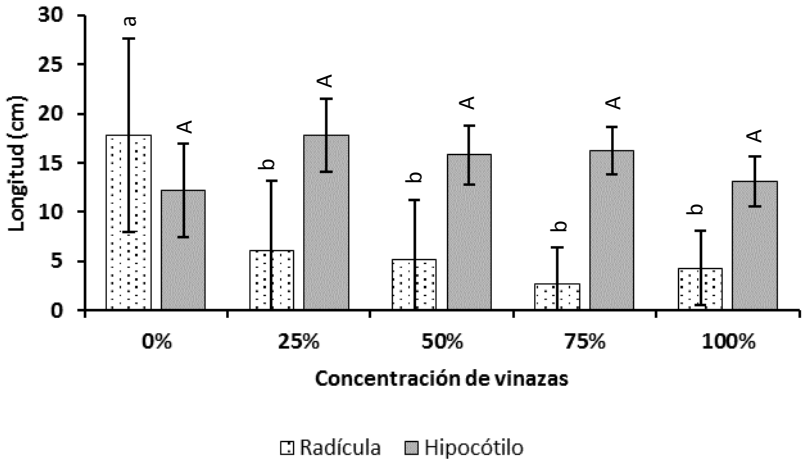

Figura 8. Longitud de radícula e hipocótilo a los 10 días de germinación y exposición a diferentes concentraciones de vinaza tequilera (0%, 25%, 50%, 75% y 100%). Letras minúsculas diferentes indican que hay diferencia significativa ($p<0.05$) en la longitud de radícula entre tratamientos. Letras mayúsculas diferentes indican que hay diferencia significativa ($p<0.05$) en la longitud del hipocótilo entre tratamientos.

7. EXPERIMENTACIÓN

Análisis de crecimiento de las plantas de maíz

Altura

En la figura 9 se observa que las plantas de maíz alcanzaron su máxima altura a los dos meses de riego con vinaza (25%, 50% y 75%) y agua en todos los tratamientos fertilizados y no fertilizados. La irrigación con vinazas no tuvo un efecto significativo en el crecimiento de las plantas de maíz en las concentraciones de vinazas probadas (25%, 50% y 75%) con respecto al riego con agua, independientemente de la fertilización. La irrigación con vinazas no detuvo el crecimiento de las plantas de maíz, sin embargo las plantas estuvieron bajo estrés hídrico, ya que el crecimiento y desarrollo de maíz está fuertemente influenciado por los niveles de riego, de acuerdo con Cakir (2004), siendo la altura máxima observada de 86 cm, mientras que en la literatura las plantas de maíz llegan hasta los 2–2.5 metros en una temporada bajo condiciones de invernadero (Bakht *et al*., 2006).

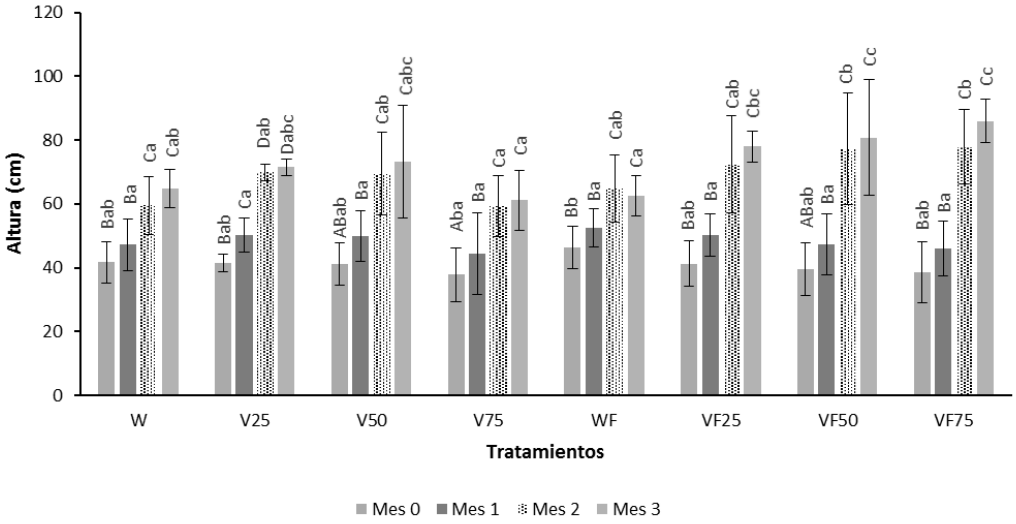

Figura 9. Altura de las plantas de maíz después de 3 meses de riego con vinaza o agua. Letras mayúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) en el tratamiento durante el tiempo. Letras minúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos en un mismo tiempo. * significa que existe diferencia significativa con o sin fertilización. Las barras representan la desviación estándar. n=6.

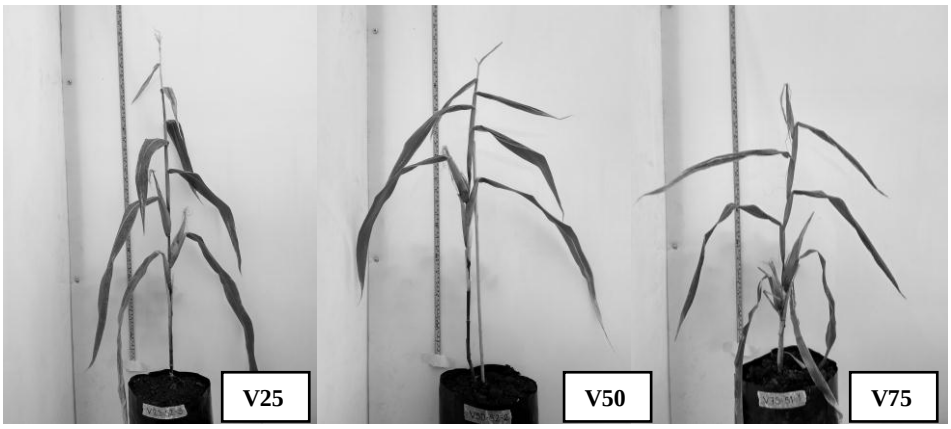

Figura 10. Altura máxima final de plantas de maíz con riego de vinazas y agua en la experimentación.

Número de hojas

En la figura 11 se observan los resultados del número de hojas de las plantas de maíz durante el tiempo. No se observó diferencia significativa en el número de hojas de las plantas de maíz después de tres meses de riego con vinazas a cualquiera de las concentraciones probadas (V25, V50 y V75) y con agua.

El promedio de número de hojas por planta durante el experimento fue de 6±1. No hubo diferencia significativa entre el número de hojas en los tratamientos fertilizados y no fertilizados.

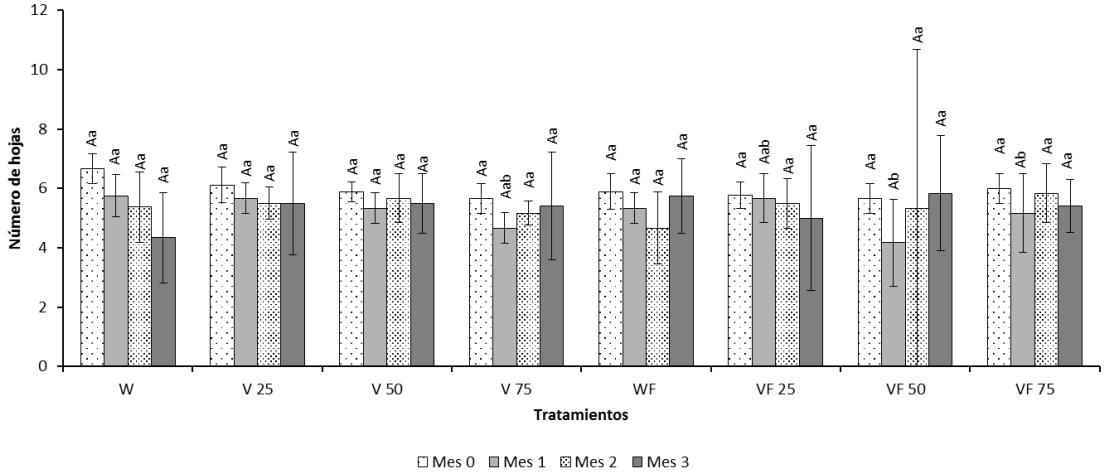

Figura 11. Número de hojas en las plantas de maíz. Letras mayúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) en el tratamiento durante el tiempo. Letras minúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos en un mismo tiempo. * significa que existe diferencia significativa con o sin fertilización. Las barras representan la desviación estándar. n=6.

Farooq *et al*., (2015) reportan que la salinidad en el suelo puede reducir el desarrollo de las hojas al afectar directamente la elongación celular, así mismo, acelerar la abscisión. Sin embargo, el aumento de la CE en el suelo por el riego con vinazas (Ver apartado Conductividad eléctrica) durante la experimentación no influencia en el número de hojas al compararlo con el tratamiento con agua, independientemente de la fertilización.

Índice de clorofila (ICC)

El índice de clorofila en las plantas de maíz en los tratamientos sin fertilizar tuvo una disminución significativa en el segundo y tercer mes sin mostrar diferencia significativa entre estos dos tiempos para todos los tratamientos con riego con vinazas y con agua. No se observó diferencia significativa en el índice de clorofila de las plantas irrigadas con vinazas (25%, 50% y 75%) comparadas con el riego con agua.

No se presentaron diferencias significativas en el índice de clorofila en las plantas sin fertilizantes con aquellas que recibieron una fertilización mínima. Las plantas fertilizadas

presentaron el mismo efecto que las no fertilizadas. Aparentemente el ICC no se ve afectado de manera significativa por el riego con vinazas, pero sí disminuyó con el tiempo de experimentación bajo riego con vinazas y agua. Sánchez-Lizárraga (2016) encontró que las plantas de *Chlorophytum comosum* al estar expuestas a vinazas del tequila con riegos frecuentes durante cuatro meses en concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% presentaron clorosis, atribuyéndose este efecto a la acumulación de sales provocada por el riego con vinazas. Al respecto Sheng *et al.,* (2008) encontraron que las plantas de maíz al crecer en suelos salinos o con alta concentración de sales presentaron clorosis, aumentando la afectación sobre la fotosíntesis. Así mismo se ha reportado que las plantas de maíz bajo estrés salino presentan un incremento de la captura del ion Na^+ en hojas, lo cual conlleva a una disminución en el CO_2 intercelular, lo que produce un efecto negativo el crecimiento y en el desarrollo de las hojas, y una limitación en la carboxilación en las funciones bioquímicas de la planta, lo cual genera una disminución de la fotosíntesis de la planta (Farooq *et al*., 2015).

Sin embargo estos efectos no se pueden atribuir al riego con vinazas, debido a que se observa igual comportamiento entre los tratamientos regados con agua. La disminución se puede atribuir a la presencia de una plaga de araña roja (*Tetranychus spp*.), la cual se presentó en el mes dos y mes tres de la experimentación (Figura 13). Landeros *et al*., (2013) reportaron que *Tetranychus spp.*, reduce la fotosíntesis, afecta la apertura de los estomas, la transpiración y el contenido de clorofila; asimismo, Reddy y Baskaran (2006), observaron que con una población de 15 individuos por hoja, en tan sólo 37 días, redujeron la capacidad fotosintética de las hojas del rosal en un 50%.

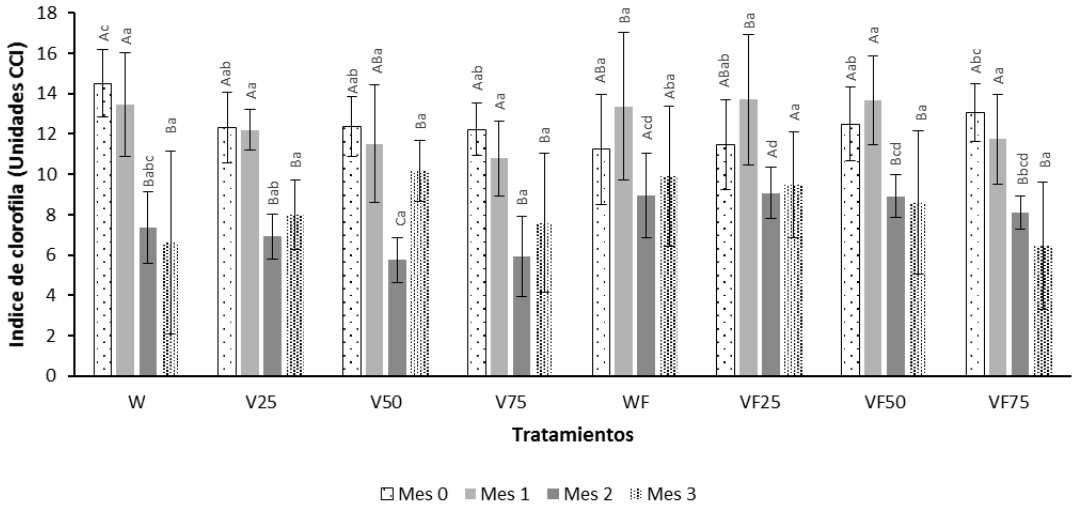

Figura 12. Índice de clorofila de plantas de maíz durante 3 meses de riego con vinaza. Letras mayúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) en el tratamiento durante el tiempo. Letras minúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos en un mismo tiempo. * significa que existe diferencia significativa con o sin fertilización. Las barras representan la desviación estándar. n=6. Las unidades CCI son el valor relativo de clorofila, se calcula como el % de transmitancia a 931 nm/ % de transmitancia a 653 nm.

Figura 13. Planta de maíz en floración con presencia de araña roja (Tetranychus spp) en el ápice.

Eficiencia fotoquímica

La eficiencia fotoquímica no presentó diferencias significativas en el tiempo de experimentación en todos los tratamientos, ya sean irrigados con vinaza o con agua, independientemente de la fertilización (Figura 14).

Las variaciones en la eficiencia fotoquímica de las plantas de maíz durante el tiempo, se pueden atribuir al funcionamiento de los sistemas fotosintéticos de la planta por la etapa fenológica en la que se encontraba. Fageria *et al*., (2006) reportan que la disminución en la eficiencia fotosintética es consecuencia tanto de la senescencia de los hojas de las plantas de maíz, así como por el incremento de la respiración durante los estados de llenado de grano. Es comprensible que a partir del mes dos se observara esta disminución, dado que en este tiempo la planta se estaba preparando para la floración, donde se sabe su actividad fotosintética varia para la acumulación de foto-asimilados que serán utilizados en la etapa productiva (Taiz *et al*., 2010). Cervantes-Martínez *et al.*, (2004) señalaron que las plantas pueden presentar una disminución en los valores de radio de fluorescencia (R F690/F640) cuando están bajo algún tipo de estrés fisiológico, tal como infección por virus, bacterias y hongos en plantas, entre otros.

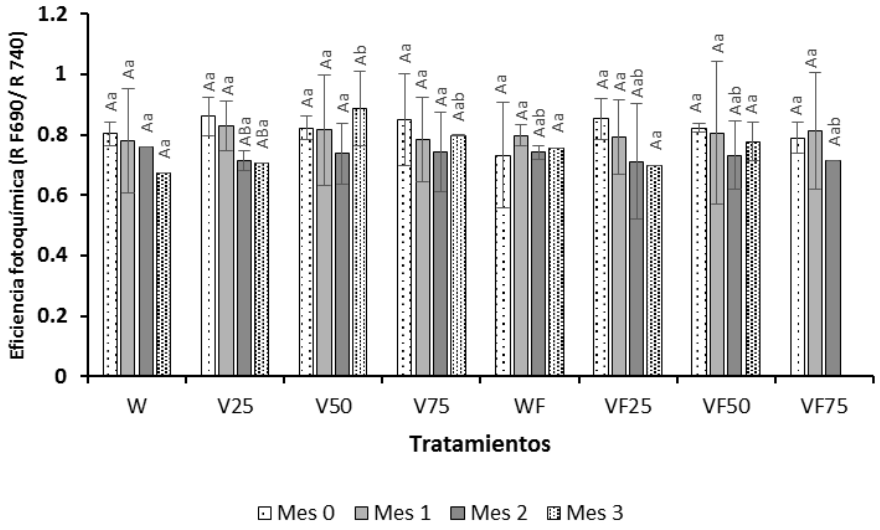

Figura 14. Eficiencia fotoquímica de plantas de maíz. Letras mayúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) en el tratamiento durante el tiempo. Letras minúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos en un mismo tiempo. * significa que no existe diferencia significativa con o sin fertilización. Las barras representan la desviación estándar. n=3.

Es importante señalar que entre el mes dos y tres se presentó un plaga de araña roja (*Tetranychus spp*.), lo cual también pudo influenciar la eficiencia fotoquímica de las plantas de maíz, al someterlas a un estrés fisiológico (Figura 13).

Biomasa

La figura 15 muestra los resultados de la biomasa. Al inicio de la experimentación se muestra homogeneidad en la biomasa de las plantas de maíz, después de tres meses de riego con las diferentes concentraciones de vinazas y agua no se observó diferencia significativa. El mismo comportamiento se observó en los tratamientos fertilizados y no fertilizados. Sin embargo, sí se observó una disminución en biomasa en el tratamiento con riego de vinaza al 75%.

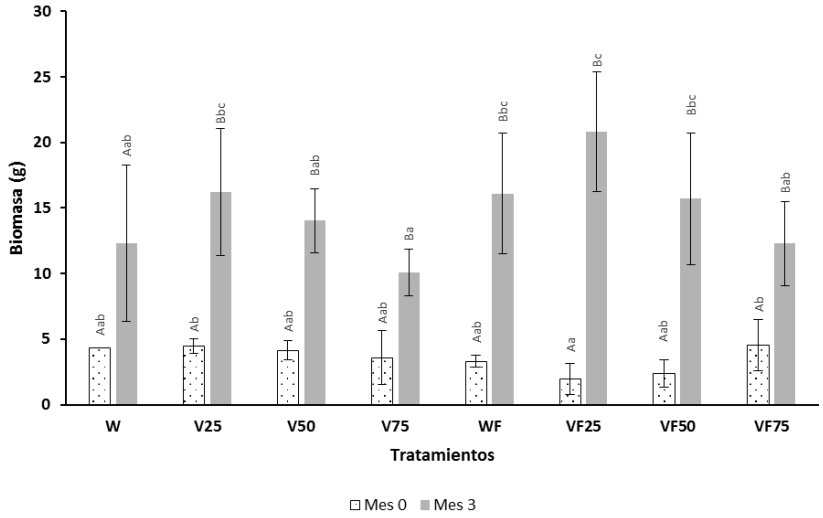

Figura 15. Biomasa de plantas de maíz después de tres meses de experimentación de riego con vinaza o agua. Letras mayúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) en el tratamiento durante el tiempo. Letras minúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos en un mismo tiempo. * significa que existe diferencia significativa con o sin fertilización. Las barras representan la desviación estándar. n=6.

Figura 16 Desarrollo de las plantas del maíz durante los tres meses de experimentación, plantas al mes 0 sin riego con vinazas (lado izquierdo) y mes 2 con riego con vinaza (lado derecho).

Esta disminución en el crecimiento puede estar atribuido a la gran cantidad de fenoles totales como el ácido ferúlico presente en las vinazas. De acuerdo a Bergmark *et al*., (1992), el ácido

ferúlico a 250 µM (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.

Fries *et al*., (1997) encontraron que a concentraciones de quercetina de 30 mg/kg suelo agregados cada 4 días, se presentó una inhibición en el crecimiento (peso seco de trébol y sorgo). Con las vinazas tequileras se agregaban entre 11 (30%) y 23 (60%) mg/kg de suelo de fenoles totales aproximadamente cada 5 días, por lo que se presentó un efecto inhibitorio en el crecimiento de maíz en la concentración de 60%.

Porcentaje de colonización

En la figura 17 se observó una disminución significativa en el porcentaje de colonización en las raíces de maíz después de tres meses de riego con vinazas en las tres concentraciones probadas (25%, 50% y 75%) en los tratamientos sin fertilizar comparados con el riego con agua.

En los tratamientos fertilizados se observó un mayor porcentaje de colonización con respecto a los no fertilizados con las tres concentraciones de vinazas probadas (25%, 50% y 75%), sin embargo este aumento no fue significativo. El porcentaje de colonización no tuvo cambios significativos con respecto al tratamiento con agua fertilizado.

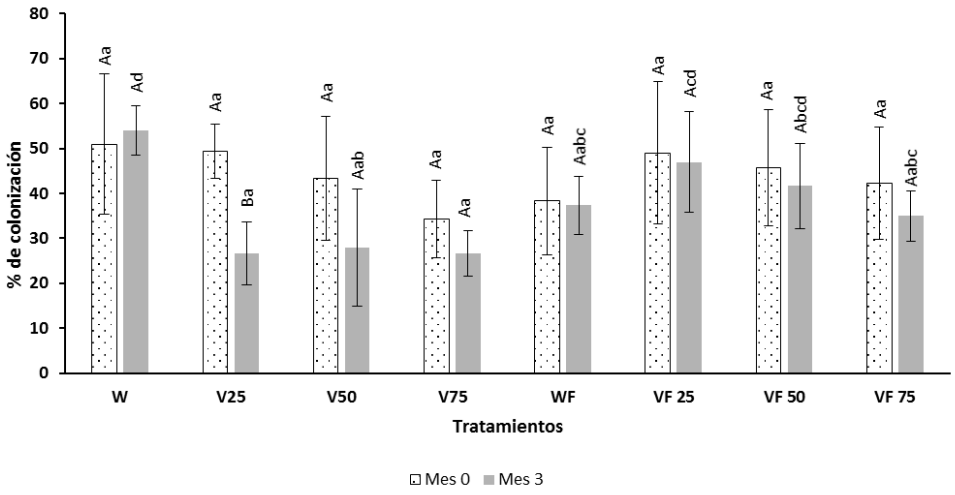

Figura 17 . Porcentaje de colonización en raíz por HMA después de tres meses de riego con vinazas tequileras. Letras mayúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) en el tratamiento durante el tiempo. Letras minúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos en un mismo tiempo. * significa que existe diferencia significativa con o sin fertilización.

De acuerdo con Serralde *et al.,* (2004) el comportamiento de los HMA en maíz regado con efluentes de la industria alcoholera se puede mantener estable en el tiempo y no verse afectado por las aplicaciones de diferentes cargas de materia orgánica, ni por el tipo de hospedero seleccionado. Estos autores concluyeron esto al utilizar maíz y efluentes de la industria alcoholera. En el presente trabajo, el poco efecto encontrado en la colonización por HMA en las plantas de maíz a las diferentes concentraciones de vinazas aplicadas sugiere algún tipo de adaptación de los HMA a las condiciones que las vinazas promueven en el suelo (i.e. cambios de pH, salinidad, contenido elevado de materia orgánica, fenoles, etc).

Caso contrario a lo observado por Montenegro (2008), donde los suelos con aplicación al 100% de vinazas alcoholeras presentaron menor colonización en plantas de maíz, atribuyéndoselo a algún compuesto de la vinaza, que posiblemente inhibió el desarrollo de las micorrizas, como los fenoles o a la cantidad de sales que contienen las vinazas.

Densidad de esporas de HMA en suelo post-experimentación

La densidad de esporas disminuyó con el tiempo del experimento sin mostrar diferencias significativas independientemente del riego con agua o con vinaza en cualquiera de las concentraciones evaluadas (25%, 50% y 75%). La densidad de esporas disminuyo con el

aumento de la concentración de las vinazas utilizadas (25%, 50% y 75%) al final de los 3 meses de riego (Figura 18).

En los tratamientos fertilizados se observó el mismo comportamiento sin diferencias significativas entre las plantas regadas con las concentraciones de vinaza, agua y en el tiempo; con excepción de la vinaza fertilizada al 75% (VF75) donde sí se observó una disminución significativa de la densidad de esporas en el mes 3. 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.

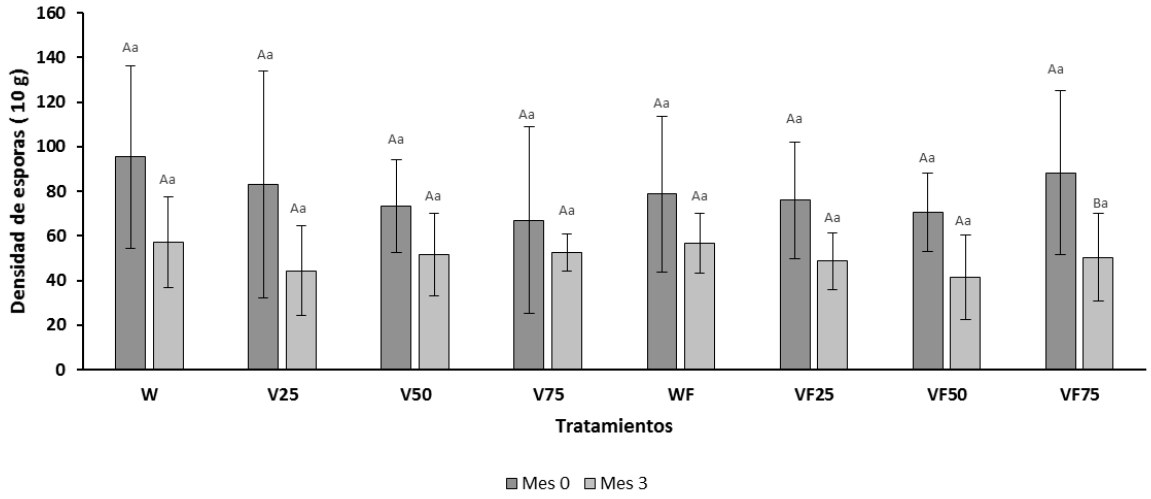

Figura 18 . Abundancia de esporas en suelo después de tres meses de cultivo de maíz irrigado con vinazas tequileras. Letras mayúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) en el tratamiento durante el tiempo. Letras minúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos en un mismo tiempo. * significa que hay diferencias significativas ($p<0.05$) entre tratamientos con o sin fertilización

Sánchez-Lizárraga, (2015a) encontró que la densidad de esporas de HMA se puede ver afectada disminuyendo al ser aplicadas vinazas tequileras, esto desde una concentración de 25%, atribuyendo este efecto a la acumulación de sales en el suelo.

Abundancia relativa de esporas de HMA en el suelo

En el suelo que se utilizó para la experimentación se encontraron ocho especies de HMA al inicio y 10 especies al final de la experimentación (Tabla 5). *Acaulospora scrobiculata y A.*

morrowiae predominaron al inicio (19% y 17%) y al final de la experimentación (19% y 21% respectivamente). *Claroideoglomus etunicatum y Diversispora spurca* sólo al inicio (22% y 15%), mientras que *C.claroideum* al final (31%).

En un trabajo previo realizado por Sánchez-Lizárraga, (2015a), en el mismo sitio de estudio se encontraron *A mellea* (27%) y *Funeliformis mosseae* (25%) como las especies de HMA más abundantes, mientras que *C. etunicatum* y *D. spurca* no fueron detectadas; por otra parte *A. scrobiculata* presentó una densidad de 112±6 esporas y *A. morrowiae* 2±1 esporas en 100 g. Estas diferencias en la presencia de las especies pueden ser debidas a variaciones de las condiciones en el suelo, estacionalidad de muestreo, madurez y ciclo de vida de la planta hospedera, ya que parámetros como el pH del suelo determinan la distribución o cantidad de HMA además de regular su ciclo de vida (Smith & Read, 2008).

Morton (1986) y Abbot y Robson (1991) encontraron una mejor asociación del género *Acaulospora* en suelos ácidos, característica que concuerda la del suelo de estudio. De igual manera Azebedo *et al.*, (2014) encontraron mayor predominancia del género *Acaulospora* en suelos ácidos y con cultivo de caña de azúcar. Lo cual sugiere que es un género comúnmente asociado a caña de azúcar.

En la rizósfera de maíz se han reportado algunas especies de HMA en mayor abundancia, como son *Gigaspora gigantea*, *Rhizophagus albidus* (reportado como *Glomus albidum*), *F. mossease* (reportado como *G. mosseae*) y *C. etunicatum* (reportado como *G. etunicatum* (Jansa *et al*., 2006).

Tabla 5. Abundancia relativa de esporas de HMA encontradas en el suelo al inicio (Ti) y final (Tf) de la experimentación.

Especie HMA	**Ti**	**Tf**
Claroideoglomus etunicatum (W.N. Becker & Gerd.) C. Walker & A. Schüβler	22%	3%
Acaulospora scrobiculata Trappe	19%	19%
Acaulospora morrowiae Spain & N.C. Schenck	17%	21%
Diversispora spurca C. Walker & A. Schuessler	15%	N.D.
Acaulospora mellea Spain & N.C. Schenck	13%	6%
Entrophospora infrequens R.N. Ames & R.W. Schneid	4%	N.D.
Claroideoglomus luteum C. Walker & Schuessler	9%	N.D.
Acaulospora spinosa C. Walker & Trappe	2%	1%
Acaulospora denticulata Sieverd. & S. Toro	N.D.	1%
Acaulospora foveata Trappe & Janos	N.D.	1%
Claroideoglomus claroideum (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüβler	N.D.	31%
Funneliformis geosporum (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schüβler	N.D.	10%
Gigaspora aff. candida Bhattachariee Mukerii J.P. Tewari & Skoropad	N.D.	3%
Scutellospora aff. aurigloba (I.R. Hall) C. Walker & F.E. Sanders	N.D.	3%

N.D. No detectado

Al estimar la abundancia relativa de esporas de HMA por tratamiento utilizado (Tabla 6), observamos que en algunas especies hubo una reducción y en otras un aumento con respecto al tratamiento; en donde los tratamientos con agua (W) y agua con fertilizante (WF) presentan menores abundancia (5.71% y 4.29% respectivamente), con respecto a los tratamientos con riego de vinaza al 25%, 50% y 75% (17.14%, 14.29% y 12.86%) y riego con vinazas con fertilizante VF25%, VF50% y VF75% (15.71%, 14.29% y 15.71% respectivamente).

Tabla 6. Abundancia relativa de esporas de HMA encontradas en el suelo por tratamientos

		Tratamiento							
Tiempo	**T0**	**T3**							
Especies HMA		**W**	**V25**	**V50**	**V75**	**WF**	**VF25**	**VF50**	**VF75**
Claroideoglomus etunicatum	22%	0.0%	0.0%	0.0%	2.9%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Acaulospora scrobiculata Trappe	19%	1.5%	4.4%	2.9%	4.4%	0.0%	1.5%	2.9%	4.4%
Acaulospora morrowiae	17%	1.5%	5.9%	2.9%	0.0%	1.5%	1.5%	5.9%	4.4%
Diversispora spurca	15%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Acaulospora mellea	13%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.5%	4.4%	0.0%
Entrophospora infrequens	4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Claroideoglomus luteum	9%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Acaulospora spinosa	2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.5%	0.0%	0.0%
Acaulospora denticulata	N.D.	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.5%
Acaulospora foveata	N.D.	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Claroideoglomus claroideum	N.D.	2.9%	5.9%	2.9%	4.4%	1.5%	2.9%	0.0%	4.4%
Funneliformis geosporum	N.D.	0.0%	0.0%	2.9%	1.5%	0.0%	5.9%	1.5%	0.0%
Gigaspora aff. candida	N.D.	0.0%	1.5%	2.9%	0.0%	1.5%	0.0%	0.0%	0.0%
Scutellospora aff. aurigloba	N.D.	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.5%	0.0%	1.5%

Esta variación de abundancia por tratamiento se puede deber a que existen reportes de distintos ecotipos de HMA formados bajo condiciones específicas de perturbación como son sequía, salinidad, temperatura extrema, contaminación, entre otros (Lenoir *et al*., 2016), lo que explica que algunas especies estén más adaptadas a las condiciones de aplicación de vinazas que otras. Y que la adición de enmiendas orgánicas ayuda a promover la presencia de HMA en suelos perturbados (Montiel-Rozas *et al*., 2016)

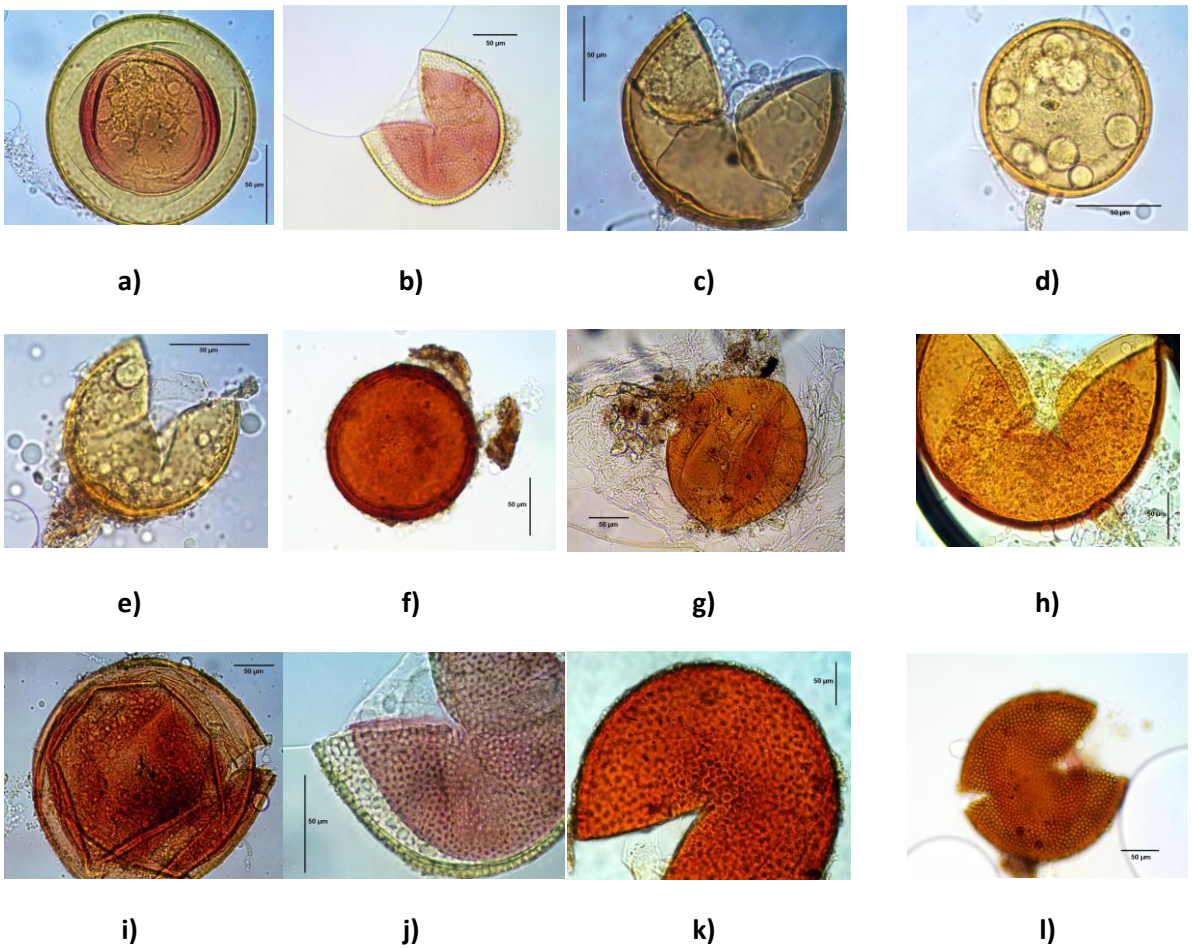

Figura 19 Especies de HMA encontradas durante la experimentación. a) *Acaulospora morrowiae,* b) *A. a scrobiculata,* c) *Claroideoglomus claroideum,* d) *C. claroideum,* e) *C. etunicatum,* f) *Funneliformis geosporum,* g) *Gigaspora candida,* h) *G. candida,* i) *Scutellospora* aff. *aurigloba,* j) *A. scrobiculata,* k) *A. foveata,* i) *A. denticulata.*

Análisis de resultados del suelo

pH

El pH en el suelo en los tratamientos sin fertilizante no muestra diferencia significativa en el tiempo de experimentación, ya sea irrigado con agua o con vinazas (25%, 50% y 75%).

El pH del suelo en los tratamientos fertilizados presentó un incremento significativo en el tiempo con la aplicación con vinazas en las tres concentraciones probadas. Además el pH fue significativamente mayor (pH 6.1) con la irrigación con vinazas (VF25%, VF 50% y VF 75%) que con agua (pH 4.72). Lo anterior sugiere un efecto de alcalinización por la descomposición de la materia orgánica o por la adición de sales en las vinazas y por el fertilizante. 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. Resultados similares fueron encontrados por Mojica, (1999) y Armengol *et al*., (2003) al aplicar vinazas alcoholeras a concentraciones de 300, 400 y 500 m^3 Ha^{-1} se relacionó el contenido de arcillas y su saturación por bases haciendo el intercambio de bases elevado, condiciones que contribuyeron a contrarrestar los efectos acidificantes que producen estos residuos.

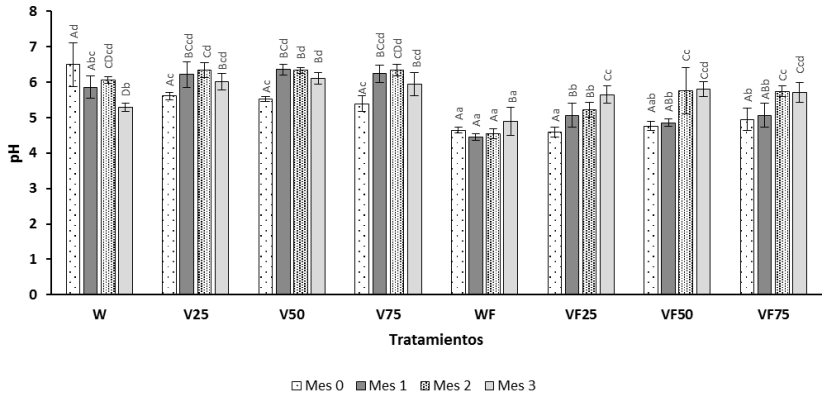

Figura 20. pH en suelo con el establecimiento de una planta de maíz después de tres meses de ser irrigado con vinazas y agua. Letras mayúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) en el tratamiento durante el tiempo. Letras minúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos en un mismo tiempo.* significa que existe diferencia significativa con o sin fertilización. Las barras representan la desviación estándar. n=6.

Conductividad eléctrica (C.E.)

En la figura 21 se observó que la C.E. del suelo tuvo un aumento significativo en el tiempo, el cual fue mayor cuando se irrigó con vinazas independientemente de su concentración (25%, 50% y 75%) comparado con la irrigación con agua en los tratamientos no fertilizados.

La C.E. en los tratamientos fertilizados tuvo un incremento significativo en el tiempo, tanto para con vinaza como riego con agua. Los tratamientos VF25 y VF50 fueron similares con respecto al tratamiento fertilizado regado con agua (WF), sin diferencias significativas en los meses uno, dos y tres. Sin embargo, el tratamiento VF75 presentó un aumento significativo en la C.E. en el mes tres comparado con el agua. Se observó un incremento significativo de la C.E. en los tratamientos fertilizados con respecto a los no fertilizados, lo cual sugiere que dicho incremento se da por la adición de vinazas que fue potenciado por la fertilización.

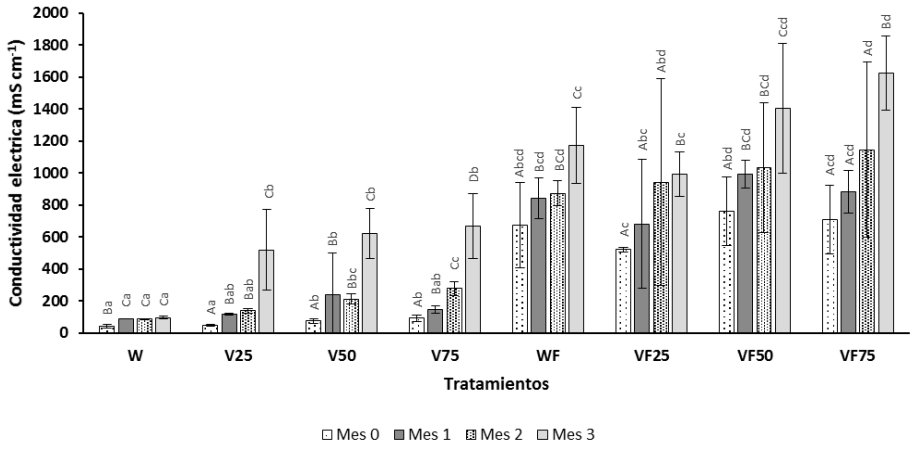

Figura 21. CE en suelo con el establecimiento de una planta de maíz después de tres meses de ser irrigado con vinazas y agua. Letras mayúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) en el tratamiento durante el tiempo. Letras minúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos en un mismo tiempo.* significa que existe diferencia significativa con o sin fertilización. Las barras representan la desviación estándar. n=6.

Se estimó que con todos los riegos con vinaza se adicionó una concentración total de 11 mg kg^{-1} de suelo de Na, 115.3 mg kg^{-1} de K, 283.3 mg kg^{-1} de Ca, 66.25 mg kg^{-1} de Mg con riego al 25% de vinaza; 22 mg kg^{-1} de Na, 230.7 mg kg^{-1} de K, 567.7 mg kg^{-1} de Ca y 132.5 mg kg^{-1}

de Mg con riego al 50% de vinaza; y 33 mg kg^{-1} de Na, 346 mg kg^{-1} de K, 851.5 mg kg^{-1} de Ca y 198.7 mg kg^{-1} de Mg con riego al 75% de vinaza.

Existen reportes de la amplia distribución de HMA en suelos salinos cuya presencia ayuda a mejorar la resistencia de las plantas hacia el estrés salino (Sheng *et al*., 2008), por lo cual se considera que la acumulación de sales en el suelo durante el riego con vinazas bajo cualquier concentración no tuvo un efecto significativo en la densidad de esporas de HMA, pero sí en la abundancia de especies presentes, esto relacionado con lo reportado por Lenoir *et al*., (2016) donde reporta que los HMA formados bajo condiciones específicas de perturbación como salinidad, entre otros, pueden estar adaptarse.

También 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) registraron conductividades de hasta 3500 µS/cm con el riego de vinaza en comparación con 2250 µS/cm en el control. Mientras que en este trabajo se tuvo 602000 µS cm^{-1}, en comparación con 94000 µS cm^{-1} con el control (agua).

Carbono orgánico total (CO)

Se observó un incremento significativo en el tiempo en el contenido de carbono orgánico total en el suelo por la irrigación con vinaza y agua en el tiempo.

El incremento en el contenido de CO en el suelo no difirió de manera significativa entre las concentraciones de vinazas evaluadas (25%,50% y 75%) y la irrigación en los tratamientos fertilizados y no fertilizados. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos fertilizados y no fertilizados, sin embargo sí se observó un aumento en el contenido de CO con el incremento de la concentración de vinazas con respecto al riego con agua (Figura 22).

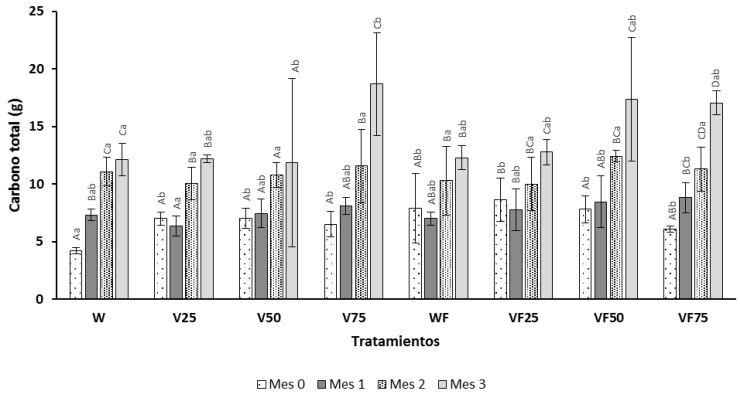

Figura 22. CO en suelo con el establecimiento de una planta de maíz después de tres meses de ser irrigado con vinazas y agua. Letras mayúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) en el tratamiento durante el tiempo. Letras minúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos en un mismo tiempo.* significa que existe diferencia significativa con o sin fertilización. Las barras representan la desviación estándar. n=6.

Nitrógeno inorgánico total (NIT)

La figura 23 muestra un aumento significativo en la concentración de NIT en los tratamientos de riego con vinazas (VF25%, VF50% y VF75%) en el mes tres tanto para las muestras fertilizadas y no fertilizadas con respecto a los tratamientos que solo sólo fueron regados con agua. Este aumento fue mayor aunque no significativo con la vinaza al 25%, presentando una disminución conforme iba en aumento la concentración de vinazas, independiente de la fertilización adicionada.

Esto se puede deber a que las plantas de maíz en los primeros meses presentaron condiciones fisiológicas adecuadas y a que el nitrógeno aportado por las vinazas fue mineralizado lentamente, estando disponible para las plantas como NH_4^+ y NO_3^- hasta llegar a un punto de acumulación en suelo..

Tal es el caso reportado por Martin-Olmedo *et al*., (1999) quienes observaron que la aplicación de vinazas de remolacha al suelo durante tres años incrementó el potencial de mineralización del nitrógeno en donde afirmaron que el nitrógeno mineral (NO_3^- y NH_4^+) puede mineralizarse lentamente en forma inorgánica disponible para las plantas.

Caso contrario a lo reportado por Bengtsson *et al*., (2003), los cuales afirman que la aplicación de vinazas al suelo puede estimular la actividad microbiana, ya que los microorganismos utilizan la materia orgánica aplicada como sustrato de carbono y el nitrógeno lo incorporan a su tejido y material celular lo que induce la inmovilización del nitrógeno y su poco disponibilidad para las plantas.

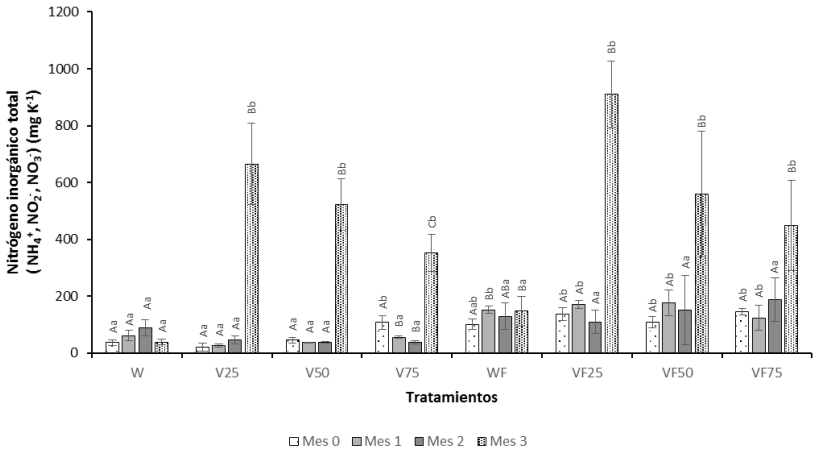

Figura 23. Nitrógeno inorgánico total en suelo con el establecimiento de una planta de maíz después de tres meses de ser irrigado con vinazas y agua. Letras mayúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) en el tratamiento durante el tiempo. Letras minúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos en un mismo tiempo. * significa que existe diferencia significativa con o sin fertilización. Las barras representan la desviación estándar. n=6

Fósforo disponible

La concentración de fósforo disponible medido como fosfatos (PO_4) en el suelo después de la aplicación de los tres meses de riego con vinazas fue de 2.16 mg k^{-1} (vinaza al 25%), 1.8 mg kg^{-1} (vinaza al 50%), 2.38 mg kg^{-1} (vinaza al 75%) (Figura 24), en donde no se observó un incremento significativo en la cantidad de fósforo disponible con respecto al inicial que contenia el suelo (29.62 mg kg^{-1}), independientemente del tratamiento fertilizado y no.

Esto sugiere que el fósforo disponible adicionado por vinazas al suelo (67.6-326.7 mg L^{-1}) fue aprovechado por la planta de maíz o estaba en forma no disponible (en forma de biomasa microbiana o ligado a materia orgánica) debido a que no se midió fosforo orgánico en las muestras de suelo. La mejora en la adquisición de fósforo por parte de las plantas es una de las

principales ventajas de la colonización por HMA, las cuales segregan fosfatasas al suelo, promoviendo su transporte desde el hongo hasta la planta (Almagrabi y Abdelmoneim, 2012).

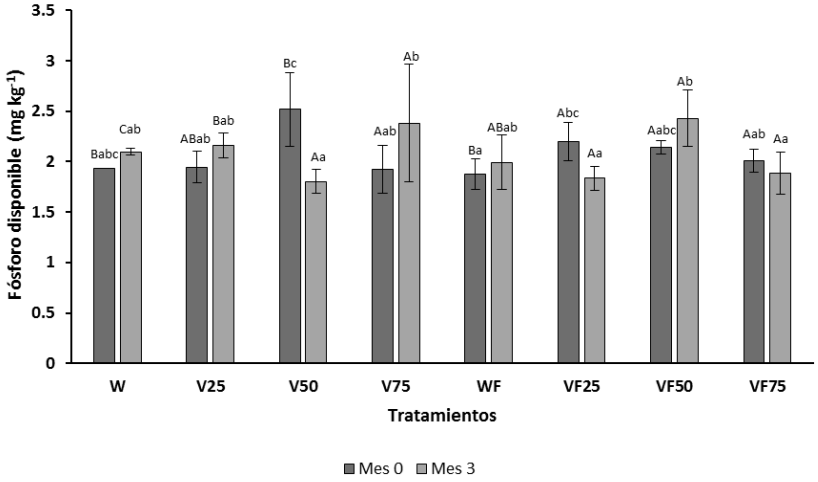

Figura 24. Fósforo disponible en suelo con el establecimiento de una planta de maíz después de tres meses de ser irrigado con vinazas y agua. Letras mayúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) en el tratamiento durante el tiempo. Letras minúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos en un mismo tiempo. * significa que existe diferencia significativa con o sin fertilización. Las barras representan la desviación estándar. n=6.

Fenoles:

La concentración de fenoles totales en el suelo mostró un aumento significativo en los tratamientos con vinazas despúes de tres meses de riego, tanto para las muestras fertilizadas y no fertilizadas. Este aumento fue significativamente mayor en las muestras irrigadas con vinazas contra las irrigadas con agua y se presentó en cualquier concentración de vinaza aplicada (25%, 50% y 75%).

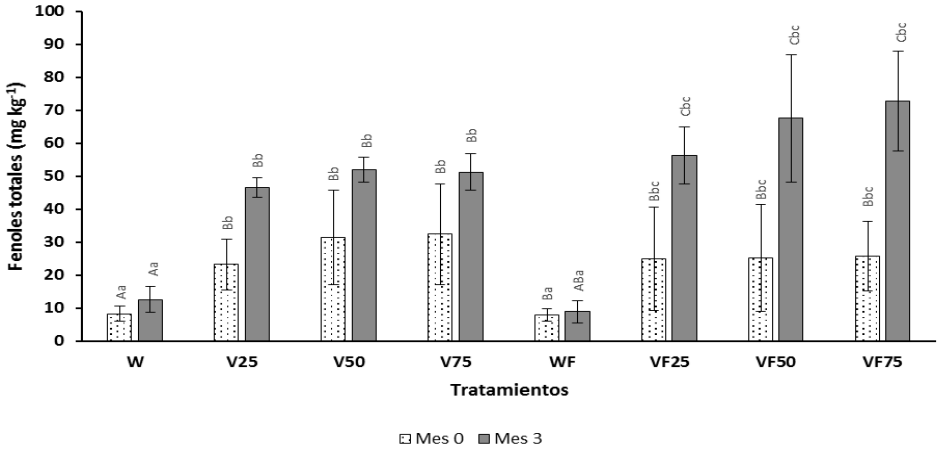

Figura 25. Concentración de fenoles totales en suelo con el establecimiento de una planta de maíz después de tres meses de ser irrigado con vinazas y agua. Letras mayúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) en el tratamiento durante el tiempo. Letras minúsculas diferentes muestran que existe diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos en un mismo tiempo. * significa que existe diferencia significativa con o sin fertilización. Las barras representan la desviación estándar. n=6.

Al inicio de la experimentación se determinó en el suelo una concentración de fenoles de 7.4 mg kg^{-1}, al mes tres en las muestras de suelo se determinaron concentraciones de 12.54 mg k^{-1} en el tratamiento con agua, de 46.55 mg k^{-1} con vinaza al 25%, de 51.94 mg kg^{-1} con vinaza al 50% y de 51.23 mg kg^{-1} con vinaza al 75%, lo cual indicó que sí aumentó la concentración de fenoles totales en el suelo por la adición de vinazas (Figura 25).

Se realizó una estimación de la concentración de fenoles adicionados al suelo por el riego con vinaza con las concentraciones estudiadas (25%, 50% y 75%) para el Mes 0 y Mes 3 adicionando el valor inicial de fenoles en el suelo (Tabla 7).

Tabla 7. Concentración acumulada de fenoles totales adicionada por el riego de vinazas en la experimentación.

	[FT] acumulada *(mg/kg suelo)	
Concentración de vinazas	**Mes 0**	**Mes 3**
25%	130.13	553.06
50%	260.26	1106.12
75%	390.39	1659.18
A	28.3	28.3

Comparando los resultados obtenidos en la determinación de concentración de fenoles totales en suelo con respecto a lo estimado por la adición de vinazas, se observa una concentración menor al tiempo 0, de 46.55 mg kg^{-1} a 553.06 mg kg^{-1} para 25%, 51.94 mg kg^{-1} a 1106.12 mg kg^{-1} para 50% y de 51.23 mg kg^{-1} a 1659.18 mg kg^{-1} para 75% de vinaza, lo cual sugiere que pudo existir una remoción de los fenoles en el suelo durante la experimentación.

Shreenivasa *et al*., (2011) determinaron que existió una degradación de compuestos fenólicos en raíces de tomate, al presentarse una mayor actividad de polifenol oxidasa (25.8% más) en plantas micorrizadas con *Rhizophagus fasciculatum* (citado como *Glomus fasciculatum*) que en las no micorrizadas.

Las enzimas fenol oxidasas, tal como la lacasa, son importantes para la degradación de fenoles para su polimerización (humificación), degradación de lignina, la solubilización y 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).

Algunos estudios señalan que hay muy poca actividad de las enzimas fenol oxidasa en un pH arriba de 5.5 o debajo de 3.5 (Bending y Read, 1997) o que su actividad disminuye la actividad al aumentar el pH y hasta una casi nula actividad en pH alcalino (7-8) (Floch *et al*., 2007). En la experimentación se obtuvieron valores de pH entre 5.3 hasta 6, favorables para que la actividad de dichas enzimas pudiera haber influido en la remoción de los compuestos fenólicos adicionados. Considerando que en el mes 0 se obtuvieron valores de % colonización de alrededor de 30 a 40%, por lo se pudo observar que puede existir una actividad de remoción de compuestos fenólicos por los microorganismos presentes y la asociación con HMA

8. ANÁLISIS MULTIVARIADO

Correlaciones de Pearson (r)

La tabla 8 muestra el análisis de correlación de Pearson realizado entre cada una de las variables del estudio. Esta correlación va de -1 a +1 y mide la fuerza de la relación linear que

existe entre estas variables. Esta tabla muestra que la altura, biomasa, carbono orgánico total, índice de clorofila, nitrógeno inorgánico total, número de hojas están correlacionados positivamente entre sí, lo cual indica que existe un efecto positivo entre estos factores al estar ligadas con respecto al desarrollo y fisiología de las plantas de maíz

Caso contrario con CE, FT quienes presentan una correlación negativa con los parámetros antes mencionados, lo cual comprueba un posible efecto negativo por la acumulación de sales y compuestos fenólicos como se mencionó anteriormente, los cuales lleguen a afectar a la planta de maíz.

Para los HMA de igual manera se establece una correlación negativa entre el porcentaje de colonización y número de esporas con respecto a la conductividad eléctrica, el contenido de fenoles en suelo,

Así mismo, se presenta una correlación negativa entre los factores de nitrógeno, altura, biomasa con respecto al número de esporas de HMA, esto puede deberse que al presentarse una alta concentración de alguna variable del N, hace que la planta de maíz no requiera de la simbiosis del HMA, disminuyendo su porcentaje de colonización y número de esporas.

Tabla 8. Correlaciones de Pearson (r) para todos los parámetros estudiados

Variable	PC	H	B	C	CE	IC	FT	EF	NH_4^+	NO_2^-	NO_3^-	NT	NH	NE	pH
H	-0.3257														
B	-0.2892	0.9476*													
C	-0.4336	0.8205*	0.7202*												
CE	-0.2591	-0.5784*	-0.5505*	-0.6052*											
IC	0.3268	0.7917*	0.7188*	0.8692*	-0.3461										
FT	-0.4568	-0.6491*	-0.5497*	-0.6587*	0.4393	-0.4392									
EF	-0.2604	0.5114	0.562*	0.0977	0.0257	0.3246	-0.138								
NH_4^+	-0.3418	0.7873*	0.7721*	0.5851*	-0.5211*	-0.5023	-0.8254*	-0.3601							
NO_2^-	-0.2965	0.8886*	0.8679*	0.7471*	-0.7073*	-0.7127*	0.3511	-0.3689	0.5556*						
NO_3^-	-0.6625*	0.5912*	0.6826*	0.3866	0.3198	-0.4129	0.4972	-0.1727	0.6977*	0.5173*					
NT	-0.4071	0.8187*	0.8049*	0.6141*	-0.5609*	-0.5114	-0.8154*	-0.3583	0.9801*	0.6391*	0.746*				
NH	0.0276	0.5312*	-0.5234*	-0.5249*	-0.0946	0.7913*	-0.239	0.4921	-0.3183	-0.4758	-0.3441	-0.3466			
NE	0.4924	-0.884*	-0.8321*	-0.8621*	-0.5376*'	0.851*	-0.708*	0.3042	-0.7347*	-0.7329*	-0.6466*	-0.7459*	0.641*		
pH	-0.2447	0.4054	0.3771	0.2317	-0.2126	-0.1318	0.4467	-0.2815	0.385	0.1557	0.2683	0.3852	0.1065	-0.2435	
PO_4^+	-0.0434	0.0386	-0.0648	0.3801	0.0887	-0.2579	0.3087	0.4698	0.0402	-0.097	-0.1316	-0.0539	-0.0188	-0.2275	0.033

PC Porcentaje de colonización, H altura, B Biomasa, C Carbono orgánico total, CE conductividad eléctrica, IC Clorofila, FT Fenoles totales, EF Eficiencia fotoquímica, NH_4^+ Concentración de Amonio, NO_2^- Concentración de Nitritos, NO_3^- Concentración de Nitratos, NT Concentración de nitrógeno orgánico total, NH Número de hojas, NE Número de esporas, PO_4^+ 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 estadísticamente significativa (p-value<0.05).

Análisis de componentes principales

Los datos obtenidos de las variables evaluadas durante el estudio se sometieron a un Análisis de Componentes Principales. El componente principal 1 y 2 explicaron el 65% de la variabilidad de los datos. En el lado positivo del componente 1 se agruparon los tratamientos de los tiempos iniciales. Mientras que en el lado negativo del componente 1 se encontró a los tratamientos de los tiempos finales. Del lado positivo del componente 2 se ubicaron % Colonización, Altura, Biomasa, Número de esporas, NO_2^- y pH, mientras que en el lado negativo estuvieron número de hojas, eficiencia fotoquímica, fenoles totales, NO_3^-, NH_4^+y NIT.

En el componente 2 se observó que entre menor se la concentración de fenoles en suelo, mayor será la biomasa,. Este mismo comportamiento se observó para el nitrógeno en sus formas de NO_3^+, NH_4^+ y NIT con respecto a la presencia de NO_2^-, esto atribuible al proceso de mineralización. A su vez se observa una correlación inversa en cuanto a la concentración de PO_4^+ y el porcentaje de colonización, comportamiento descrito anteriormente como factor limitante en el porcentaje de colonización en raíces.

Así mismo en el componente 1 se observó que al presentarse menor CE en el suelo se presentará mayor porcentaje de colonización, pero sin efectos significativos con respecto a la densidad de esporas presentes.

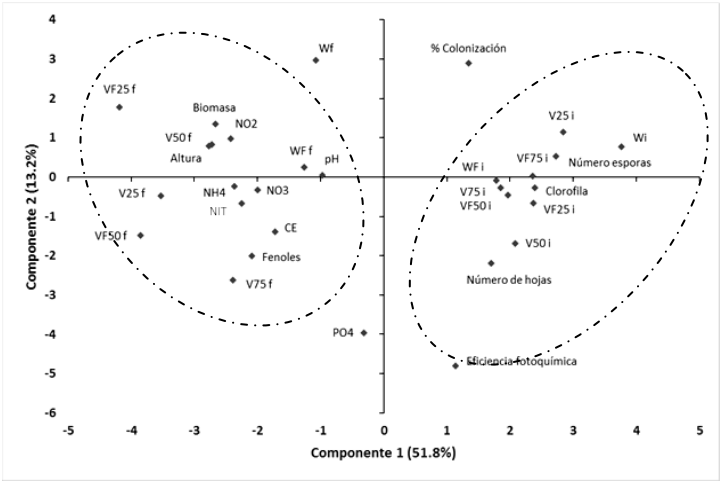

Figura 26. Análisis de componentes principales (ACP). CE conductividad eléctrica, PO_4 concentración de fósforo disponible, NIT Nitrógeno inorgánico total, NO_2^- Concentración de Nitritos, NO_3^- Concentración de nitratos, NH_4^+ Concentración de Amonio, CO Carbono orgánico total, Wi Tratamiento agua inicial, Wf tratamiento agua final, V25 i Tratamiento V25% inicial, V25 f Tratamiento V25% final, V50 i Tratamiento V50 final, V75 i Tratamiento V75 inicial, V75 f Tratamiento V75% inicial, Wf Tratamiento agua final, VF25 i Tratamiento VF25% inicial, VF25 f Tratamiento VF25% final, VF50 i Tratamiento VF50% inicial, VF50 f Tratamiento VF50% final, VF75 i Tratamiento VF75% inicial, VF75 f Tratamiento VF75% final .

9. CONCLUSIONES

La aplicación de vinazas de la industria del tequila como enmienda orgánica presenta efectos positivos y negativos en las plantas de maíz, los HMA y el suelo. Algunos de los efectos negativos observados fue la disminución tanto en la tasa de germinación de semillas de maíz y en el crecimiento de radícula e hipocótilo desde concentraciones de 25% de vinaza. Por lo que no se debe de irrigar vinaza a semillas.

En plantas adultas, la irrigación con vinaza al 25%, 50% y 75% no efecto el índice de clorofila de las plantas, la eficiencia fotoquímica, sin embargo hubo una disminución en la biomasa esto debido a la acumulación de compuestos fenólicos y aumento del aporte de sales de la vinaza.

La aplicación de vinazas con fertilizante potencializo el aumento de la conductividad eléctrica en suelo, lo cual puede suprimir el desarrollo de plantas y de los HMA, así mismo el riego con vinazas tequileras al suelo pueden aportar compuestos fenólicos que pueden ser tóxico para las plantas.

Con respecto a los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) presentes en el suelo, la adición de vinazas al 75% disminuyó la densidad de esporas de manera significativa; adicionalmente, se observó una disminución en el porcentaje de colonización de los HMA en las raíces de maíz tratadas con vinazas al 75%. Por lo que esta irrigación no sería recomendable para cultivos agrícolas asociados a HMA o donde se busque aumentar el rendimiento por está asociación.

Los efectos positivos de la irrigación de vinaza al suelo son que la materia orgánica si se mineraliza tal como fue demostrado por el alto contenido de nitrógeno inorgánico en formas asimilables por la planta (NH_4^+ y NO_3^-), así como por un aumento en el contenido de carbono orgánico.

10. RECOMENDACIONES

Es necesario hacer estudios *in situ* a largo plazo en los lugares donde se van a utilizar las vinazas tequileras como enmiendas orgánicas y su efecto asociado con diferentes niveles de fertilización de acuerdo con el de cultivo de interés, para determinar las condiciones y efectos que se pueden presentar por una aplicación constante de las vinazas, con la finalidad de evitar el empobrecimiento del suelo y la contaminación de mantos acuíferos.

Promover la generación de una normativa para el uso de aguas residuales industriales en cultivos agrícolas, como las vinazas tequileras que fueron el objeto de estudio en este trabajo, que establezcan los límites permisibles para su disposición considerando parámetros específicos que puedan afectar al suelo tales como contenido de sales, fenoles, fósforo, etc, al cultivo y al producto final del cultivo.

11. BIBLIOGRAFÍA

Ahumada, P.& Gómez, R. 2009. Evaluación y selección de Bacterias degradadoras de fenol por respirometría. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología

Akram, M., Ashraf, M. Y., Jamil, M., Iqbal, R. M., Nafees, M., & Khan, M. A. (2011). Nitrogen application improves gas exchange characteristics and chlorophyll fluorescence in maize hybrids under salinity conditions. Russian Journal of Plant Physiology, 58(3), 394–401. https://doi.org/10.1134/s1021443711030022

Almagrabi, O.A., Abdelmoneim, T.S., 2012. Using of arbuscular mycorrhizal fungi to reduce the deficiency effect of phosphorous fertilization on maize plants (Zea mays L.). Life Sci. J. 9, 1648–1654.

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., Muñiz-Martínez, R., 2009. Profiling of phenolic compounds of somatic and reproductive tissues of agave durangensis gentry (Agavaceae). American Journal of AppliedSciences 6, 1076–1085.

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., Muñiz-Martínez, R., 2009. Profiling of phenolic compounds of somatic and reproductive tissues of agave durangensis gentry (Agavaceae). Am. J. Appl. Sci. 6, 1076–1085. doi:10.3844/ajassp.2009.1076.1085

Amador M. (2002) Efecto de vinazas en agave tequilero en la nutrición y su relación con problemas fitosanitarios. Departamento de fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México, México

American Public Health Association (APHA), 1999. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association American Water Works Association Water Environment Federation, 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.

Ángel S. y Menjívar J.C. (2010) Cambios en fracciones de fósforo en Inceptisoles y Mollisolespor aplicaciones de vinaza y/o cloruro de potasio. Acta Agronómica.59.356-362.

Armengol, J. E., Lorenzo, R., & Fernández, N. (2003). Utilización de la vinaza como enmienda orgánica y su influencia en las propiedades químicas de vertisoles y en los rendimientos de la caña de azúcar. Cultivos Tropicales, 24, 67–71.

Armengol, J.E., Lorenzo, R., Fernández, N., 2003. Utilización de la vinaza como enmienda orgánica y su influencia en las propiedades químicas de vertisoles y en los rendimientos de la caña de azúcar. Cultiv. Trop. 24, 67–71.

Atlas, R.M., Bartha, R., 2001. Ecología microbiana y Microbiología ambiental.

Bakht, J., Ahmad, S., Tariq, M., Akber, H., Shafi, M., 2006. Response of Maize To Planting Methods. J. Agric. Biol. Sci. 1, 8–14.

Banco mundial. Indicadores del desarrollo mundial (s.f.) Consultado el 01 de febrero, 2017. de http://databank.bancomundial.org/data/reports.aspx?source=2&series=AG.CON.FERT.ZS&country=

Bautista Zúniga, F., & Durán de Bazúa, M. del C. (1998). Análisis del beneficio y riesgo potenciales de la aplicación al suelo de vinazas crudas y tratadas biológicamente. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 14(1), 13–19.

Bautista Zúniga, F., Durán de Bazúa, M. del C., 1998. Análisis del beneficio y riesgo potenciales de la aplicación al suelo de vinazas crudas y tratadas biológicamente. Rev. Int. Contam. Ambient. 14, 13–19.

Bebé F.V. *et al*., (2008). Desenvolvimento do milho e alteracoes químicas em solo sobaplicacao de vinhaca. Revista de biología e Ciencia da terra.8. 191-196.

Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., Malajczuk, N., 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture, Canberra, Australia.

Brundrett, M.C., Melville, L., Peterson, L. (Eds.), 1994. Practical Methods in Mycorrhizal Research. Mycologue, Sydney, B.C., Canada.

Camargo-Ricalde, Sara Lucía; Noé Manuel Montaño; Claudia Janette De la Rosa-Mera y Susana Adriana Montaño Arias "Micorrizas: una gran unión debajo del suelo" Revista Digital Universitaria [en línea]. 1 de julio de 2012, Vol. 13, No.7 [Consultada: 2 de julio de 2012]. Disponible en Internet: [http://www.revista.unam.mx/vol.13/num7/art72/index.html] ISSN: 1607-6079.

Campagnac, E., Khasa, D.P., 2014. Relationship between genetic variability in {<}i{>}Rhizophagus irregularis{<}/i{>} and tolerance to saline conditions. Mycorrhiza 24, 121–129. doi:10.1007/s00572-013-0517-8

CETESB, 2006. P4.231. Vinhaça: critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola, Brazil.

Consejo Regulador del Tequila, 2015. Consumo de agave para Tequila y Tequila 100% de agave [WWW Document]. URL https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/ (accedido 6.28.15).

Dane J.H., Top C (eds) (2002) Methods of Soil Analysis. Part. 4 Physical Methods.Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.

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. doi:10.1016/j.geoderma.2003.08.016

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 Vignaangularis, Vigna cylindrical and Sorghum cernum.Annals of Environmental Science, 5(2).

Driessen, P., Deckers, J., & Nachtergaele, F. (2001). Lecture notes on the major soils of the world. World Soil Resources Reports (Vol. 60). Rome.

España-Gamboa E et al., (2011). Vinasses: Characterization and treatments. Waste Management Research.29.1235-1250.

FAO, 2015. World fertilizer trends and outlook to 2018. Rome.

FAO. (2015). World fertilizer trends and outlook to 2018. Rome.

Farooq, M., Hussain, M., Wakeel, A., Siddique, K.H.M., 2015. Salt stress in maize: effects, resistance mechanisms, and management. A review. Agron. Sustain. Dev. 35, 461–481. doi:10.1007/s13593-015-0287-0

Food and Agriculture Organization, 2001. Lecture Notes on the Major Soils of the World [WWW Document]. URL http://www.fao.org/docrep/003/y1899e/y1899e11.htm (accedido 3.10.15).

Fuess, L.T., Garcia, M.L., 2014. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. J. Environ. Manage. 145, 210–229. doi:10.1016/j.jenvman.2014.07.003

González Moreno, S., Perales Vela, H., & Salcedo Alvarez, M. O. (2008). La Fluorescencia de la Clorofila A como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. Revista de La Universidad de México, 27(4), 119–129.

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 la Sociedad Argentina Botánica 49, 473-481.

Hedimbi, M., Singh, S., & Kent, A. (2012). Laser induced fluorescence study on the growth of maize plants, 4(6), 395–401.

Heijboer, A., ten Berge, H.F.M., de Ruiter, P.C., J??rgensen, H.B., Kowalchuk, G.A., Bloem, J., 2016. Plant biomass, soil microbial community structure and nitrogen cycling under different organic amendment regimes; a 15N tracer-based approach. Appl. Soil Ecol. 107, 251–260. doi:10.1016/j.apsoil.2016.06.009

Hunt, R. Plant Growth Analysis. Studies in Biology No. 96.Edward Arnold Publishers, London.1978.

INEGI, 2010. Mapa Digital de México V6.1 [WWW Document]. URL http://gaia.inegi.org.mx/mdm6/ (accedido 7.10.15).

INVAM (2014) International Culture Collection of (Vesicular) ArbuscularMycorrhizal Fungi.<http://invam.wvu.edu/the-fungi/species-descriptions>.

Iñiguez, G., Acosta, N., Martinez, 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.

Íñiguez-Covarrubias, G., Peraza-Luna, F., 2007. Reduction of solids and organic load concentrations in tequila vinasses using a polyacrylamide (PAM) polymer flocculant. Rev. Int. Contam. Ambient. 23, 17–24.

Lamas-Robles R (2004) Industria tequilera, visión y tecnología de su desarrollo. In: Gschaedler- Mathis AC (ed) Ciencia y tecnología del tequila; Avances y perspectivas. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Guadalajara, Jalisco, México.

Lepeduš, H., Brkić, I., Cesar, V., Jurković, V., Antunović, J., Jambrović, A., Šimić, D. (2012). Chlorophyll fluorescence analysis of photosynthetic performance in seven maize inbred lines under water-limited conditions. Periodicum Biologorum, 114(1), 73–76.

Linerio-Gil, J. E., & Guzmán-Carrillo, A. (2004). Tratamiento de efluentes y aprovechamiento de residuos. In A. C. Gschaedler-Mathis (Ed.), Ciencia y tecnología del tequila; Avances y perspectivas (pp. 258-284). Guadalajara, México: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ).

López-López, A., Contreras-Ramos, S.M., 2015. Tratamiento de efluentes y aprovechamiento de residuos, in: Gschaedler Mathis, A.C., Rodriguez Garay, B., Prado Ramírez, R., Flores

Montaño, J.L. (Eds.), Ciencia Y Tecnolog{í}a Del Tequila: Avances Y Perspectivas. Centro de Investigaci{ó}n y Asistencia en Tecnolog{í}a y Dise{ñ}o 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. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 9, 109–116. doi:10.1007/s11157-010-9204-9

López-López, A., Davila-Vazquez, G., León-Becerril, E., Villegas-García, E., Gallardo-Valdez, J., 2010. Tequila vinasses: Generation and full scale treatment processes. Revista Environmental Science Biotechnology 9, 109-116.

Lüdeker, W., Dahn, H. G., Günther, K. P., & Schulz, H. (1999). Laser-induced fluorescence - A method to detect the vitality of scots pines. Remote Sensing of Environment, 68(3), 225–236. https://doi.org/10.1016/S0034-4257(98)00114-X

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. http://doi.org/10.1186/s40064-015-1193-2

Mattigod, S. V, Zachara, J.M., 1996. Chemical Methods, Methods of Soil Analysis. Soil Science Society of America, Wisconsin, USA.

Mattigod, S.V., Zachara, J.M., 1996. Part 3 Chemical Methods, Methods of Soil Analysis. Soil Science Society of America, Wisconsin, USA.

Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence--a practical guide. Journal of Experimental Botany, 51(345), 659–668. https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659

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 Phytol. 115, 495–501. doi:10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x

Minardi, S., 2015. Optimization of Nitrogen Fertilization Input on Zea mays L . Cultivation through the Biological Inhibition of Nitrification 201–207.

Mojica, F., 1999. DE LA APLICACIÓN DE SEIS DÓSIS CRECIENTES DE VINAZA EN CUATRO PROFUNDIDADES , EN DOS TIPOS DE SUELO . Dystric haplustand y Ustic 1999.

Montenegro-Gomez, S.P., 2008. Influencia de la aplicaci{ó}n de vinaza sobre la presencia, actividad y biomasa microbiana del suelo en el cultivo de ma{í}z dulce ({<}i{>}Zea mays{<}/i{>}). Universidad Nacional de Colombia.

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.

Montiel-Rozas, M. del M., López-García, Á., Kjøller, R., Madejón, E., & Rosendahl, S. (2016). Organic amendments increase phylogenetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in acid soil contaminated by trace elements. Mycorrhiza, 575–585. https://doi.org/10.1007/s00572-016-0694-3

Montiel-Rozas, M. del M., López-García, Á., Kjøller, R., Madejón, E., Rosendahl, S., 2016. Organic amendments increase phylogenetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in acid soil contaminated by trace elements. Mycorrhiza 575–585. doi:10.1007/s00572-016-0694-3

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. doi:10.1186/s40064-016-2410-3

Moreno, S. P. (2016). La cascada del nitrógeno ocasionada por actividades humanas. Oikos=, (3), 1–5.

Moreno, S.P., 2016. La cascada del nitrógeno ocasionada por actividades humanas. Oikos= 1–5.

Nalleli G.M.A.T. (2004). Compostaje de bagazo de agave con vinazas tequileras. Tesis de Maestría. CUCEI. Universidad de Guadalajara, México.

Nicasio-Arzeta, S., Sánchez-Coronado, M. E., Orozco-Segovia, A., & Gamboa-de Buen, A. (2011). Efecto del preacondicionamiento y el sustrato salino en la germinación y crecimiento de plántulas de maíz (Zea mays) raza chalqueño. Agrociencia, 45(2), 195–205.

Norma Mexicana NMX-AA-003-1980 Aguas Residuales (1980).

Norma Mexicana NMX-AA-132-SCFI-2006 Muestreo de suelos para la identificación y la cuantificación de metales y metaloides, y manejo de muestra (2006).

Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales (1996).

Norma Oficial Mexicana NOM-002-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales (1996).

Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. (2000).

Oladipo, O.G., Olayinka, A., Awotoye, O.O., 2016. Maize (Zea mays L.) performance in organically amended mine site soils. J. Environ. Manage. 181, 435–442. doi:10.1016/j.jenvman.2016.07.009

Olsen, S.R., Cole, C. V, Watanabe, F.S., Dean, L.A., 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate.

Parniske, M., 2008. Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. Nat. Rev. Microbiol. 6, 763–775. doi:10.1038/nrmicro1987

Pereira J.P. et al., (1992). Efeito da adicao de diferentesdosagens de vinhaca a um latossolo vermelho amárelo distrofico na germinacao e vigor de semetes de milho. Revista Brasileira de Sementes. 14. 147-150.

Pérez Martínez, F.J., Rodríguez González, E., Arellano Plaza, M., Camacho Ruiz, R.M., Prado Ramírez, R., 2015. Extracci{ó}n del jugo de agave, in: Gschaedler Mathis, A.C., Rodriguez Garay, B., Prado Ramírez, R., Flores Montaño, J.L. (Eds.), Ciencia Y Tecnolog{í}a Del Tequila: Avances Y Perspectivas. Centro de Investigaci{ó}n y Asistencia en Tecnolog{í}a y Dise{ñ}o del Estado de Jalisco, A.C., Guadalajara, pp. 55–95.

Pessoa de Barros R. (2009). Atributos biológicos e químicos de um solo cultivado com cana-de-acúcar (Saccharum officinarum L.)fertirrigado com vinhaca.

Piernas, V., & Guiraud, J. P. (1997). Disinfection of rice seeds prior to sprouting.Journal of food science, 62(3), 611-615.

Pineda Ruiz, E., Chico Lamas, Y., Vidal Díaz, M. L., Becerra de Armas, E., Acosta Hernández, F., Fernández Denis, I., & Lugo Ruiz, I. (2015). Uso alternativo de la vinaza en la fertilización de la caña de azúcar, efectos sobre el cultivo y el suelo. Centro Agrícola, 42(1), 31–36.

Pineda Ruiz, E., Chico Lamas, Y., Vidal Díaz, M.L., Becerra de Armas, E., Acosta Hernández, F., Fernández Denis, I., Lugo Ruiz, I., 2015. Uso alternativo de la vinaza en la fertilización de la caña de azúcar , efectos sobre el cultivo y el suelo. Cent. Agrícola 42, 31–36.

Ranum, P., Peña-Rosas, J. P., & Garcia-Casal, M. N. (2014). Global maize production, utilization, and consumption. Annals of the New York Academy of Sciences, 1312(1), 105–112. https://doi.org/10.1111/nyas.12396

Ranum, P., Peña-Rosas, J.P., Garcia-Casal, M.N., 2014. Global maize production, utilization, and consumption. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1312, 105–112. doi:10.1111/nyas.12396

Renault P, Cazevieille P, Verdier J, Lahlah J, Clara C, Favre F (2009) Variations in the cation exchange capacity of a ferralsol supplied with vinasse, under changing aeration conditions: Comparison between CEC measuring methods. Geoderma 154: 101-110.

Retes-Pruneda, J. L., Davila-Vazquez, G., Medina-Ramírez, I., Chavez-Vela, N. A., Lozano-Alvarez, J. A., Alatriste-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(14), 1773–1784.

Rice, E.W., Baird, R.B., Eaton, A.D., y Clesceri, L.S. (2012) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (22ed.): American Water Works Association, American Public Health Association, Water Environment Federation.

Robles C. y Barea J.M. (2004). Respuesta de la planta y del suelo a la inoculación con glomus intraradices y rizobacterias en maíz en cultivo intensivo. TERRA Latinoamericana.22.12-59.

Santos M, Diánez F, de Cara M, TelloJC (2008) Possibilities of the use of vinasses in the control of fungi phytopathogens.Bioresource Technology 99: 9040-9043.

Savci, S. (2012). An Agricultural Pollutant: Chemical Fertilizer. International Journal of Environmental Science and Development, 3(1), 11–14. https://doi.org/10.7763/IJESD.2012.V3.191

Savci, S., 2012. An Agricultural Pollutant : Chemical Fertilizer. Int. J. Environ. Sci. Dev. 3, 11–14. doi:10.7763/IJESD.2012.V3.191

Schenck, N. C., & Perez, Y. (1990). Manual for identification of VA Mycorrhizal fungi. Gainsville, USA: Synergistic Publication.

SchüBler, A., & Walker, C. (2010). The Glomeromycota: A species list with new families and new genera. Gloucester, England.

Sheng, M., Tang, M., Chen, H., Yang, B., Zhang, F., & Huang, Y. (2008). Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. Mycorrhiza, 18(6), 287–296. http://doi.org/10.1007/s00572-008-0180-7

Sheng, M., Tang, M., Chen, H., Yang, B., Zhang, F., Huang, Y., 2008. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. Mycorrhiza 18, 287–296. doi:10.1007/s00572-008-0180-7

Shi, L.X., Guo, J.X., 2006. Changes in photosynthetic and growth characteristics of Leymus chinensis community along the retrogression on the Songnen grassland in northeastern China. Photosynthetica 44, 542–547. doi:10.1007/s11099-006-0068-8

SIAP-SAGARPA, 2013. Anuario estad{í}stico de la producci{ó}n agr{í}cola.

Silva, M. A. S. d., 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.

Sistema de Información Estadística y Geografía de Jalisco SIEG, 2012. [WWW Document]. URL http://sieg.gob.mx/contenido/Municipios/cuadernillos/ElArenal.pdf. accedido (accedido 12.10.15).

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. J. Sustain. Agric. 36, 36–53. doi:10.1080/10440046.2011.620226

Sparks, D. L. (1996). Chemical Methods Methods of Soil Analysis. Madison, USA: Soil Science Society of America.

Sperberg, F.S., Juan Hirzel Campos, 2011. Uso de enmiendas orgánicas como fuente de fertilización en cultivos 1–30.

Tadeu, L. & Loureiro M. (2014). Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. Journal of Environmental Management, 210-229.

Taiz, L., Zeiger, E., 2006a. Fisiología Vegetal, Tercera ed, USA.

Taiz, L., Zeiger, E., 2006b. Plant physiology, USA.

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I.M., Murphy, A., 2010. Plant Physiology and Development, Sixth. ed. Sinauer Associates, Inc. Publisher, Sunderland, Massachusetts.

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, Ecosystem &. Environment. 119, 289-298.

U S Environmental Protection Agency, 2004. Guidelines for Water Reuse. Development 26, 252.

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.

Valdivia-Bernal, Roberto, Caro-Velarde, F. de Jesús, Medina-Torres, Raúl, Ortiz-Catón, Margarito, Espinosa-Calderón, Alejandro, Vidal-Martínez, Víctor A., & Ortega-Corona, Alejandro. (2010). Contribución genética del criollo jala en variedades eloteras de maíz. Revista fitotecnia mexicana, 33(spe4), 63-67.

Van Hoorn, J.W., Katerji, N., Hamdy, A., Mastrorilli, M., 2001. Effect of salinity on yield and nitrogen uptake of four grain legumes and on biological nitrogen contribution from the soil. Agric. Water Manag. 51, 87–98. doi:10.1016/S0378-3774(01)00114-7

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 Agronomia. 64, 5755-5767.

Zhang, X., Zhu, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Liu, S., Guo, J., Li, R., Wu, S., Chen, B., 2014. Growth and metal uptake of energy sugarcane (Saccharum spp.) in different metal mine tailings with soil amendments. J. Environ. Sci. 26, 1080-1089.

Zhao, G., Duan, Z., Ming, L., Li, Y., Chen, R., Hu, J., Han, Y. (2016). Reflectance and fluorescence characterization of maize species using field laboratory measurements and lidar remote sensing. Applied Optics, 55(19), 5273. https://doi.org/10.1364/AO.55.005273