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

Efecto de la aplicación de vinazas tequileras sobre los procesos de nitrificación, desnitrificación y emisiones de gases con efecto invernadero en suelos agrícolas

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN LA ESPECIALIDAD DE
INGENIERÍA AMBIENTAL

PRESENTA

L.Q. RENE GUADALUPE MORAN SALAZAR

Directora: Dra. Silvia Maribel Contreras Ramos

Co-Directora: Dra. Erika Nahomy Marino Marmolejo

GUADALAJARA, JAL. DICIEMBRE DE 2015

CIENCIA Y TECNOLOGIA

Guadalajara, Jalisco a 20 de Noviembre del 2015

CONSEJO GENERAL DEL POSGRADO
INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del estudiante L.Q. René Guadalupe Morán Salazar, una vez leída y revisada la Tesis titulada "Efecto de la aplicación de vinazas tequileras sobre los procesos de nitrificación, desnitrificación y emisiones de gases con efecto invernadero en suelos agrícolas" aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencia y Tecnología en la opción terminal de Ingeniería Ambiental durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente a los 20 del mes de Noviembre del año 2015

Dr. Gustavo Dávila Vázquez
Tutor Académico

Dra. Erika Nahomy Marino Marmolejo
Tutor en Planta

Dra. Silvia Maribel Contreras Ramos
Director Académico

CIENCIA Y TECNOLOGIA

Guadalajara, Jalisco a 11 de Diciembre del 2015

CONSEJO GENERAL DEL POSGRADO
INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del Jurado del Examen de Grado del estudiante L.Q. René Guadalupe Morán Salazar, una vez leída y revisada la Tesis titulada "Efecto de la aplicación de vinazas tequileras sobre los procesos de nitrificación, desnitrificación y emisiones de gases con efecto invernadero en suelos agrícolas" aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencia y Tecnología en la opción terminal de Ingeniería Ambiental durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente a los 11 del mes de Diciembre del año 2015

Dr. Eloy Conde Barajas
Presidente

Dra. Dioselina Álvarez Bernal
Secretaria

Dra. Silvia Maribel Contreras Ramos
Vocal

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento

A Dios, porque es mi fortaleza y sabiduría,

A la doctora Silvia Maribel Contreras Ramos mi directora de tesis por planear, dirigir y mantener el desarrollo del proyecto de investigación; así como por su enseñanza y por todo el tiempo invertido en el mismo,

A la doctora Erika Nahomy Marino Marmolejo por sus enseñanzas y apoyo en el desarrollo de la experimentación de biología molecular,

Al doctor Luc Dendooven por permitirme trabajar en su laboratorio así como el apoyo en el desarrollo de la experimentación,

A el doctor Marco Luna Guido por su apoyo recibido durante la experimentación de gases y mineralización de nitrógeno,

Al doctor Gustavo Dávila Vázquez por sus consejos, enseñanzas y apoyo en el desarrollo del proyecto,

A mis compañeros de laboratorio Ana Lorena Sánchez Lizárraga por el apoyo durante el desarrollo del proyecto. Y a Roberto Emmanuel Bolaños Rosales por el apoyo en las técnicas de biología molecular,

A mis sinodales la doctora Dioselina Álvarez Bernal y el doctor Eloy Conde Barajas por su interés en la revisión de este trabajo,

A el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca recibida No 301727 y por el financiamiento del proyecto con el fondo SEP-CONACYT-Ciencia Básica con proyecto 181070.

Dedicatoria

A la memoria de mi padre el profesor
J. Guadalupe Moran Sánchez
ejemplo de perseverancia y constancia
y espíritu de sacrificio.

A mi mamá ***María Isabel Salazar Gómez***
porque siempre estuvo a mi lado
brindándome su apoyo, confianza y
sus consejos para hacer de mí una mejor persona

A mis hermanos ***Román y Abraham***
por darme confianza, estímulos de superación
y consejos que se convirtieron en inspiración
para terminar este proyecto.

A ***Verónica Hernández*** *por ser parte de mi vida, brindarme el tiempo necesario para realizarme profesionalmente y su apoyo en el logro de cada una de mis metas.*

Índice general

Índice de tablas ..... **IV**

Índice de figuras ..... **VI**

Resumen ..... **X**

1 Antecedentes **3**

1.1 ¿Qué es el Suelo? **3**

1.2 Macro y micro fauna del suelo **5**

1.3 Ciclos biogeoquímico **6**

1.3.1 Ciclo del carbono 6

1.3.2 Ciclo del nitrógeno 7

1.4 El agua en el suelo **11**

1.5 Gases con efecto invernadero **12**

1.6 Aplicación de efluentes o aguas residuales al suelo **13**

1.7 Vinazas de la industria del tequila **15**

1.7.1 Características de las vinazas tequileras 16

1.8 La aplicación de vinazas al suelo y sus efectos **16**

2 Justificación **23**

3 Hipótesis y objetivos **27**

3.1 Hipótesis **27**

3.2 Objetivos **27**

4 Metodología **31**

4.1 Selección del sitio, muestreo de suelos y caracterización **31**

4.2 Mineralización de carbono (C) y nitrógeno (N) en el proceso de nitrificación 32

4.3 Producción de gases con efecto invernadero **33**

4.4 Identificación de bacterias y arqueas en suelos regados con vinazas y agua 34

4.4.1 Extracción de ADN 34

4.4.2 Amplificación PCR, construcción de la librería de ARNr16S 34

4.5 Análisis fisicoquímicos **37**

4.5.1 pH 37

4.5.2 Humedad 37

4.5.3 Cenizas 38

4.5.4 Conductividad eléctrica 38

4.5.5 Carbono Orgánico Total 38

4.5.6 Textura 39

4.5.7 Capacidad de Intercambio Catiónico 40

4.5.8 Nitrógeno inorgánico 40

4.5.9 Metales 42

4.5.10 Nitrógeno Total 42
4.5.11 Capacidad de Retención de Agua 43
4.5.12 Fosforo disponible 43
4.5.13 Fosforo Total 44
4.5.14 Carbono Orgánico Total en la vinaza 44
4.5.15 Demanda química de Oxigeno 45
4.5.16 Demanda Biológica de Oxigeno 45
4.5.17 Producción de CO_2 45
4.5.18 Análisis estadístico 46

5 Resultados y discusión 49

5.1 Caracterización del suelo y las vinazas tequileras 49
5.1.1 Caracterización del suelo 49
5.1.2 Caracterización de vinazas 51

5.2 Mineralización de Carbono 53

5.3 Mineralización de Nitrógeno 54

5.4 Producción de Gases de efecto invernadero (GEI) 61
5.4.1 Emisiones de dióxido de carbono (CO_2) 62
5.4.2 Emisiones de óxido nitroso (N_2O) 65
5.4.3 Emisiones de metano (CH_4) 68
5.4.4 Estimación de emisiones de GEI 71

6 Conclusiones 77

7 Recomendaciones 81

8 Bibliografía 85

Índice de tablas

Tabla 1. Generación de gases efecto invernadero en suelos por la adición de diferentes productos en las actividades de agricultura. 14

Tabla 2. Tratamientos para nitrificación y desnitrificación. 32

Tabla 3. Caracterización del suelo vinaza y control y comparación con la normativa mexicana y americana. 50

Tabla 4. Caracterización de la vinaza tequilera utilizada en este trabajo y comparación con otro tipo de vinazas y con la norma mexicana y americana. 52

Tabla 5. Identificación por DGGE de bacterias y arqueas presentes en los suelos control y vinaza. 60

Tabla 6. Análisis de varianza utilizando PROC GLM (SAS, 1989) para probar las diferencias significativas entre los tratamientos (suelo, CRA, tiempo, tipo de riego) y sus interacciones con la prueba de Tukey (HSD) (Tipo I) sobre la mineralización de CO_2 y Nitrógeno (N min) y emisiones de GEI. 71

Tabla 7. Estimación de emisiones de GEI con diferentes tipos de vinaza y las vinazas utilizadas en este trabajo. 73

Índice de figuras

Figura 1. Clasificación de la biota del suelo en relación al tamaño de partícula y de poro en el suelo (adaptado de (Gisi et al., 1997)..... 4

Figura 2. Ciclo del carbono general, adaptada de (Osman, 2013)..... 7

Figura 3. Transformación del nitrógeno orgánico e inorgánico por medio de los procesos de nitrificación y desnitrificación en el suelo (comunicación personal)..... 9

Figura 4. Representación esquemática de algunos procesos que podrían verse afectados por la adición de vinazas al suelo (comunicación personal). 18

Figura 5. Triangulo textural (FAO, 2014)..... 39

Figura 6. Producción de CO_2 durante la mineralización del carbono en suelo control y vinaza. Letras minúsculas diferentes significan diferencias significativas entre CRA al mismo tiempo, mientras que letras mayúsculas diferentes significan diferencias significativas entre el tiempo en la misma CRA. * Significa diferencias significativas entre el suelo control (SC) y suelo vinaza (SV). ° significa diferencias significativas diferente riego agua (A) o vinaza (V)..... 54

Figura 7. NH_4^+ y NO_2^-en suelo control y vinaza con $P < 0.05$ en $n = 9$. Letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas entre CRA al mismo tiempo, mientras que letras mayúsculas diferentes significan diferencias significativas entre el tiempo en la misma CRA. * Denota diferencias significativas entre el suelo control (SC) y suelo vinaza (SV). ° significa diferencias significativas diferente riego agua (A) o vinaza (V)..... 55

Figura 8. Nitratos en suelo control y vinaza con $P < 0.05$ en $n = 9$. Letras minúsculas diferentes significan diferencias significativas entre CRA al mismo tiempo, mientras que letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas entre el tiempo en la misma CRA. * Denotan diferencias significativas entre el suelo control (SC) y suelo vinaza (SV). ° Denota diferencias significativas diferente riego agua (A) o vinaza (V)..... 56

Figura 9. Mineralización de N en suelo control y vinaza con P < 0.05 en n = 9. Letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas entre CRA al mismo tiempo, mientras que letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas entre el tiempo en la misma CRA. * Denotan diferencias significativas entre el suelo control (SC) y suelo vinaza (SV). ° Denota diferencias significativas diferente riego agua (A) o vinaza (V)..... 58

Figura 10. Emisiones de CO_2 en suelo control y vinaza con P < 0.05 en n = 9. Letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas entre la CRA en el mismo tiempo, mientras que letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas entre el tiempo en la misma CRA. * denotan diferencias significativas entre el riego con agua (A) y vinaza (V). ° significa diferencias significativas entre tratamientos, con o sin el acetileno. 63

Figura 11. Emisiones de N_2O en suelo control y vinaza con P < 0.05 en n = 9. Letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas entre la CRA en el mismo tiempo, mientras que letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas entre el tiempo en la misma CRA. * denotan diferencias significativas entre el riego con agua (A) y vinaza (V). ° denotan diferencias significativas entre tratamientos, con o sin el acetileno. 67

Figura 12. Emisiones de CH_4 en suelo control y vinaza con P < 0.05 en n = 9. Letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas entre la CRA en el mismo tiempo, mientras que letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas entre el tiempo en la misma CRA. * Denota diferencias significativas entre el riego con agua (A) y vinaza (V). ° Denota diferencias significativas entre tratamientos, con o sin el acetileno. 69

Resumen

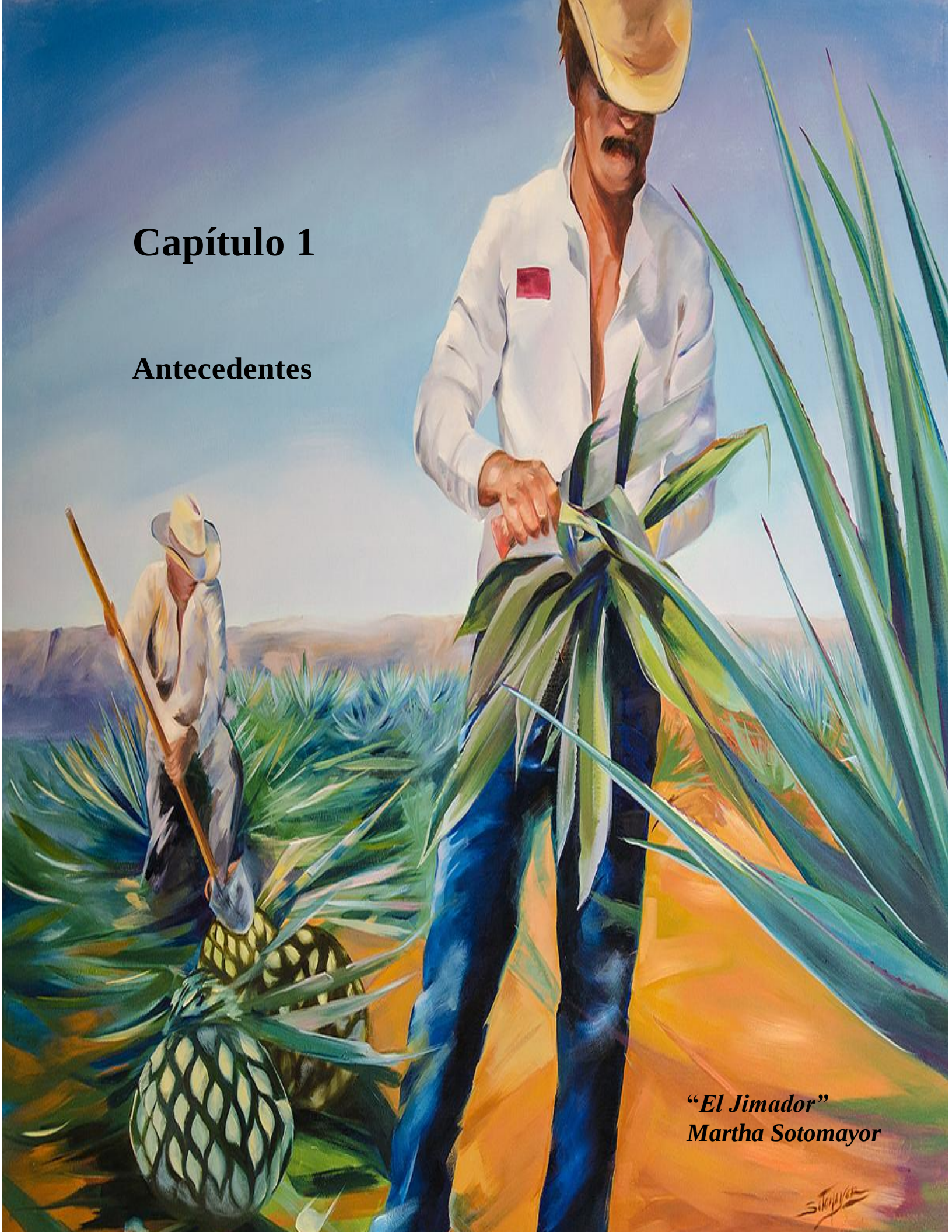
La vinaza tequilera es un agua residual generada después de la producción de tequila y se caracterizan por su elevada concentración de materia orgánica de 35 a 60 g L^{-1} como DBO. Esta elevada carga orgánica hace suponer que su aplicación al suelo puede ser benéfica para las plantas y/o microorganismos. Sin embargo, existen poca o nula información sobre los efectos que se ocasionan en el suelo. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue generar conocimiento sobre el efecto de las vinazas en la mineralización de carbono y nitrógeno y la generación de gases con efecto invernadero (GEI) en un suelo agrícola.

En este estudio se utilizó un suelo agrícola irrigado frecuentemente con vinazas (SV) y otro que presuntivamente no fue regado con vinazas (SC), los experimentos se evaluaron en diferentes concentraciones de capacidad de retención de agua (CRA) (40, 80 y 100%) con aplicación de vinazas (SC-V o SV-V) o agua (SC-A ó SV-A).

Los resultados obtenidos indicaron que producción de CO_2 en el tratamiento SC-V-100 fue de 2, 676 mg C-CO_2 kg^{-1} suelo en base seca a los 70 días, mientras que cuando fue regado con agua se tuvo una concentración de 1,013 mg C-CO_2 kg $suelo^{-1}$. Al irrigar el SC y SV con vinaza en las tres diferentes CRA´s menos del 4% del nitrógeno fue mineralizado a los70 días. Las emisiones de CO_2 aumentaron de 2 a 20 veces más que cuando se regó con agua, de 6 a 767 veces más en N_2O y 1 a 8 veces más en CH_4 para todas las CRA´s. Haciendo una estimación con las emisiones encontradas en este trabajo, se estima que por cada litro de vinaza irrigada al suelo se pueden generar desde 1.86 hasta 17 kg CO_2-eq ha^{-1} $año^{-1}$ (CO_2, N_2O y CH_4) en condiciones anaerobias. Por otra parte, si fueran utilizadas el total de vinazas generadas en la industria del tequila para el riego de suelos se podrían generar 132.5 Gg de CO_2-eq, esto representaría el 0.017% de las emisiones que se generan por fertilización química (771,869 Gg de CO_2-eq) y 0.07% por aplicación de estiércol (186,505 Gg de CO_2-eq).Por otro lado, el análisis molecular (PCR-DGGE) de las poblaciones microbianas indicó la presencia de arqueas en los suelos de estudio, con los géneros *Crenarchaeote* sp., *Nitrososphaera* sp., *Thaumarchaeote* sp. y *Nitrosotalea* sp., *Euryarchaeote* sp,. *Methanosarcina* sp. y bacterias los géneros *Bacillus* sp., *Sphingomonas* sp., *Methylobacterium* sp., *Massilia* sp. y *Clostridium beijerinckii*, de los cuales la mayoría de ellos mineralizan N hasta nitratos, producen N_2O o CH_4 y otros pueden oxidar el CH_4 a CO_2.

Capítulo 1

Antecedentes



"El Jimador"
Martha Sotomayor

1 Antecedentes

1.1 ¿Qué es el Suelo?

El suelo es la mezcla de material mineral y orgánico en la superficie terrestre la cual es capaz de sostener la vida en el planeta (Thompson, 1952). Los elementos que son requeridos por las plantas son encontrados en el suelo sobre toda la superficie de la Tierra en proporciones variables. El suelo está formado de partículas minerales, sustancias orgánicas, aire, agua y organismos vivos. Lo cual hace del suelo una entidad natural que evoluciona a través del tiempo debido a diferentes procesos naturales (Osman, 2013).

La estructura del suelo regula un gran número de funciones ecológicas, incluyendo la infiltración, percolación y retención del agua, intercambio de gases, materia orgánica y dinámicas de nutrientes minerales, biomasa microbiana, y la susceptibilidad del suelo a la erosión (Bottinelli et al., 2015). Los procesos biológicos del suelo son muy diversos y complejos. Las características físicas y químicas del suelo, el clima, las comunidades de plantas y microorganismos así como las prácticas agrícolas, influyen tanto positiva como negativamente en la fertilidad del suelo (Abbott y Murphy, 2007).

El suelo se divide en tres fracciones de tamaño de partícula, la fracción de arena con un diámetro equivalente de 50 o 63 a 2000 micras, la fracción de sedimento o limo (2-50 o 63 micras) y la fracción de arcilla (< 2 µm). La proporción de cada fracción del suelo se define como la textura del suelo, la cual es una propiedad crucial para su funcionamiento y que se determina en dos niveles: de la fase gaseosa (suelo-aire) y la fase acuosa (suelo-agua o solución del suelo) (Gisi et al., 1997).

Los suelos arenosos tienen un mayor volumen total disponible para el agua y el aire, lo cual garantiza una mejor aireación, percolación y evaporación del agua. Por el contrario, los suelos arcillosos tienen numerosos poros capilares que retienen agua, con menor aireación y circulación del agua. Estas propiedades son determinantes para los microorganismos, ya que estos influyen en el balance entre procesos biológicos de oxidación y reducción los cuales impulsan los ciclos geoquímicos en el suelo. La textura del suelo y el tamaño de los poros del

suelo también son importantes ya que influyen en la distribución de los organismos del suelo. Buscot y Varma (2005) presentaron una clasificación de la distribución de los organismos en base a la dimensión de las partículas y los poros del suelo (Figura 1). Dentro esta clasificación del suelo podemos observar que en suelos con alto contenido de arcilla y limo se encuentra toda la microfauna, los cuales podrían ayudar a procesar la materia orgánica presente en el suelo y hacerla disponible en forma de materia inorgánica para las plantas. Sin embargo, esta clasificación no es limitativa en la presencia de otros organismos.

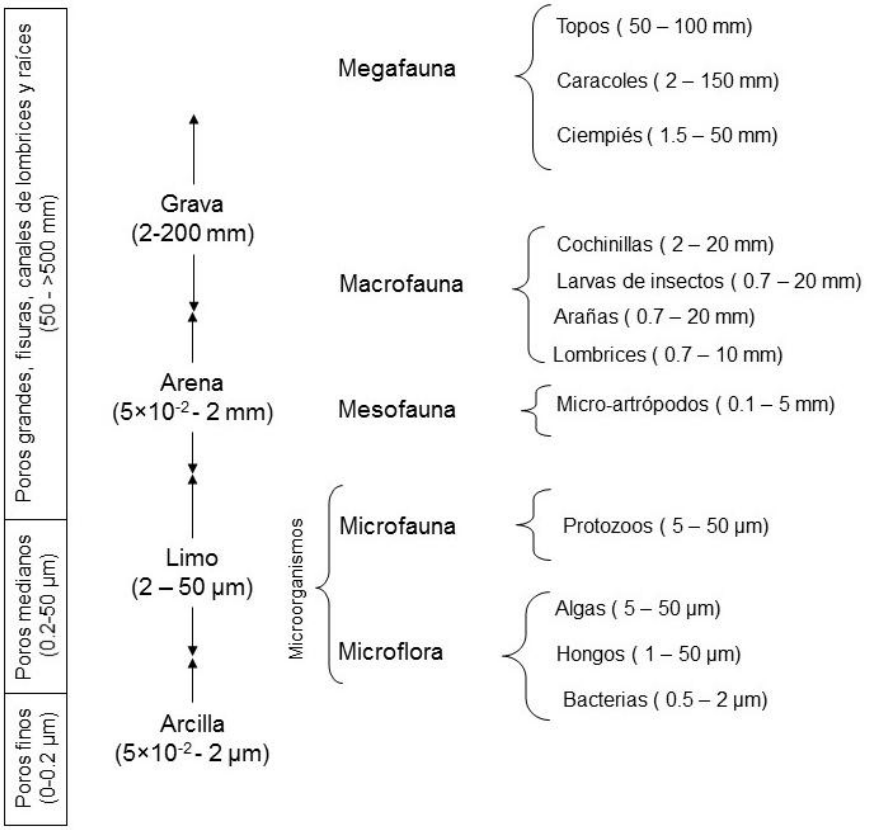


Figura 1. Clasificación de la biota del suelo en relación al tamaño de partícula y de poro en el suelo (adaptado de (Gisi et al., 1997).

1.2 Macro y micro fauna del suelo

Una de las actividades humanas más importantes que depende del suelo y que tiene el potencial de ejercer un gran impacto en el suelo, es la agricultura. Los suelos utilizados para la agricultura comprenden hasta 1/3 parte de la superficie total de la Tierra, esta actividad ha causado aumentos en la erosión, pérdida de materia orgánica, y cambios en las comunidades microbianas en suelo (Tilman et al., 2001). Se ha estimado que un suelo agrícola puede contener 30 millones o más de bacterias, cientos de miles de hongos y decenas de miles de protozoarios y algas en un gramo de suelo(Thompson, 1952). También se estima que en un suelo agrícola en los primeros 15 cm de la superficie hay alrededor de 160 g de biomasa de bacterias por m^3 de suelo y 200 g de biomasa de hongos por cada m^3 de suelo (Campbell, 1987).

Teuscher y Adler (1960) estimaron que en una hectárea de suelo se puede encontrar alrededor de 4×10^5 animales vertebrados (ej. ratones, topos, conejos, ardillas), 4×10^{17} animales artrópodos (ej. tijerillas, ácaros, hormigas, crustáceos), 2.5×10^9 animales no artrópodos (ej. nemátodos y lombrices) y 2.75×10^{18} microorganismos (ej. bacterias, hongos, actinomicetos, algas y protozoos). De este último grupo de microorganismo las bacterias son las predominantes en el suelo y se pueden aislar con relativa facilidad de suelos aerobios, neutros o ligeramente alcalinos, donde constituyen hasta el 20 o 30% (en peso) del total de la biomasa. Muchos de los grupos de bacterias tiene un papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos (ciclo del nitrógeno, carbono, fósforo, etc.) en el suelo, ejemplos de estos grupos son bacterias de los géneros *Pseudomonas, Nitrobacter, Nitrosomonas, Azotobacter* y *Rhizobium*, por mencionar sólo algunos (Campbell, 1987). Muchas bacterias son responsables de la mineralización de la materia orgánica que se adiciona o está presente en el suelo, y son parte fundamental de los procesos de nitrificación y desnitrificación, los cuales se describirán posteriormente.

1.3 Ciclos biogeoquímicos

Para crecer, reproducirse y mantener su integridad estructural y funcional, los organismos vivos seleccionan un número limitado de compuestos químicos de su entorno para construir moléculas orgánicas que forman las unidades básicas de las células. Al morir estos organismos, liberan constituyentes orgánicos de vuelta al medio ambiente, los cuales son aprovechados por otros organismos (ej. microorganismos) que convierten la materia orgánica en materia inorgánica. Así, cualquier elemento biológico se somete a un ciclo continuo llamado "ciclo biogeoquímico", en el que se pasa alternativamente de un mineral a un compuesto orgánico, dicho de otra manera del estado de no-vida a un estado de la materia viva (Bertrand et al., 2015).

En otras palabras un ciclo biogeoquímico es un equilibrio que existe entre la abundancia de un elementó en la litosfera y la biosfera (Exley, 2003). De los 92 elementos principales de la tabla periódica, sólo alrededor de 30, son considerados como elementos fundamentales para los organismos vivos. Los cuatro elementos más abundantes son el oxígeno, carbono, hidrógeno y nitrógeno, que constituyen alrededor del 97-99% de la masa de la mayoría de las células. Otros elementos (hierro, azufre, fósforo, manganeso, magnesio, calcio, cobre, zinc, molibdeno, etc.) representan sólo una fracción muy pequeña de la materia viva, sin embargo son esenciales para la vida (Bertrand et al., 2015). Dentro de los ciclos biogeoquímicos en que los elementos están presentes, se pueden listar el ciclo del carbono, del nitrógeno, azufre, etc.

1.3.1 Ciclo del carbono

Las grandes reservas de carbono se generan en la litosfera, la biosfera, la atmósfera y la hidrosfera. Transferencias masivas de carbono se producen entre la litosfera, la biosfera, los mares, otros cuerpos de agua, y la atmósfera como parte del ciclo global del carbono (Schlesinger, 1997). El carbono se almacena en forma de CO_2 en la atmósfera (2%), como biomasa en plantas y suelos (5%), como combustibles fósiles en una variedad de depósitos geológicos (8%), y como iones en el océano (85%) (Figura 2).

En el ecosistema terrestre, los principales depósitos de carbono son la biomasa sobre el suelo, la capa de hojarasca, el suelo y las raíces de las plantas (Osman, 2013). El carbono almacenado en la atmósfera (CO_2) es absorbido por las plantas y convertido por la clorofila en carbohidratos y proteínas. Los animales toman el carbono a través de las plantas y carne de otros animales. Solamente una fracción del CO_2 que absorben las plantas del aire vuelve a este durante la respiración animal ya que la mayor parte se queda retenida en los tejidos.

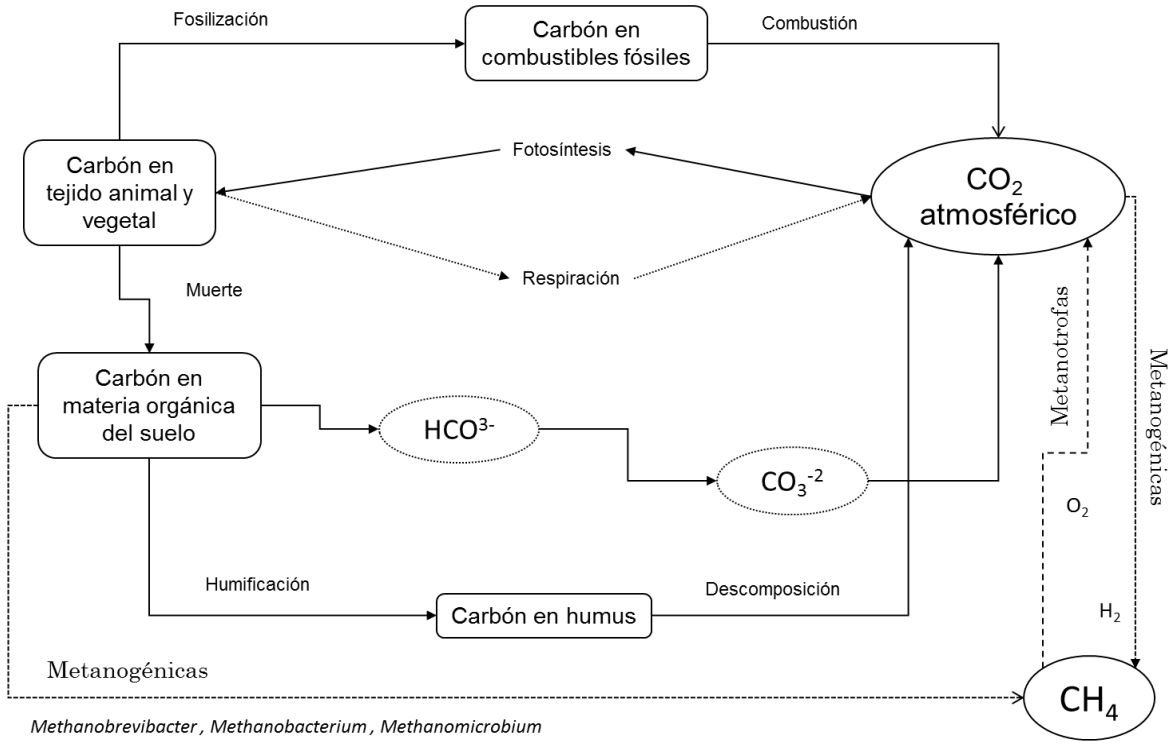


Figura 2. Ciclo del carbono general, adaptada de (Osman, 2013).

1.3.2 Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno (N) es requerido por todos los organismos como un nutriente esencial. En ecosistemas terrestres, el N generalmente tiene una disponibilidad limitada para las plantas, resultando en una fuerte competencia entre microorganismos y plantas por la adquisición de N (Geisseler et al., 2010). Residuos de plantas y animales (excretas, residuos antropogénicos, hojas, residuos de cultivos, y organismos muertos) devuelven una proporción significativa de nitrógeno al suelo como nitrógeno orgánico.

El nitrógeno orgánico se mineraliza en nitrógeno inorgánico (NH_3, NO_2^- y NO_3^-) por los microorganismos presentes en el suelo. El amoníaco (NH_3) se convierte en nitratos (NO_3^-) por el proceso de nitrificación por medio de microorganismos (ej. *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*). El amoníaco también se puede volatilizar y liberarse a la atmósfera, los nitratos se pueden reducir a nitrógeno elemental mediante el proceso de desnitrificación y también liberarse a la atmósfera. Por lo tanto, el nitrógeno se mueve en un ciclo entre los componentes del suelo, los organismos y la atmósfera. Esto se conoce como el ciclo del nitrógeno (Figura 3). Los procesos biológicos principales de este ciclo son la mineralización, inmovilización, la nitrificación y la desnitrificación (Osman, 2013). Estos procesos serán descritos a continuación.

Mineralización e inmovilización del nitrógeno

Durante la descomposición de la materia orgánica los componentes nitrogenados como aminoácidos, péptidos, proteínas y nucleoproteínas que están presentes en la materia orgánica del suelo son convertidos en nitrógeno inorgánico como amonio y nitratos (NH_4^+, NO_3^-). Este proceso de conversión de nitrógeno orgánico a inorgánico es llamado *mineralización*. La velocidad de mineralización del nitrógeno se rige por el contenido relativo de carbono y nitrógeno en los residuos orgánicos. Cuanto mayor sea el contenido de nitrógeno de la materia orgánica, es decir, más estrecha es la relación C/N (< 16), más rápido es la mineralización de nitrógeno (Li y Li, 2014).

Por otro lado, cuando el contenido de nitrógeno es menor y la relación C/N > 19, los microorganismos de descomposición consumen algo de nitrógeno disponible del suelo, a este proceso que es opuesto a la mineralización se le llama inmovilización del nitrógeno. La mineralización e inmovilización pueden tener lugar simultáneamente. La naturaleza dinámica de estos procesos que compiten causa un aumento del N inorgánico del suelo o, por el contrario, una disminución cuando el N inorgánico se inmoviliza en formas orgánicas, tal como la biomasa de los microorganismos formando proteínas y enzimas celulares.

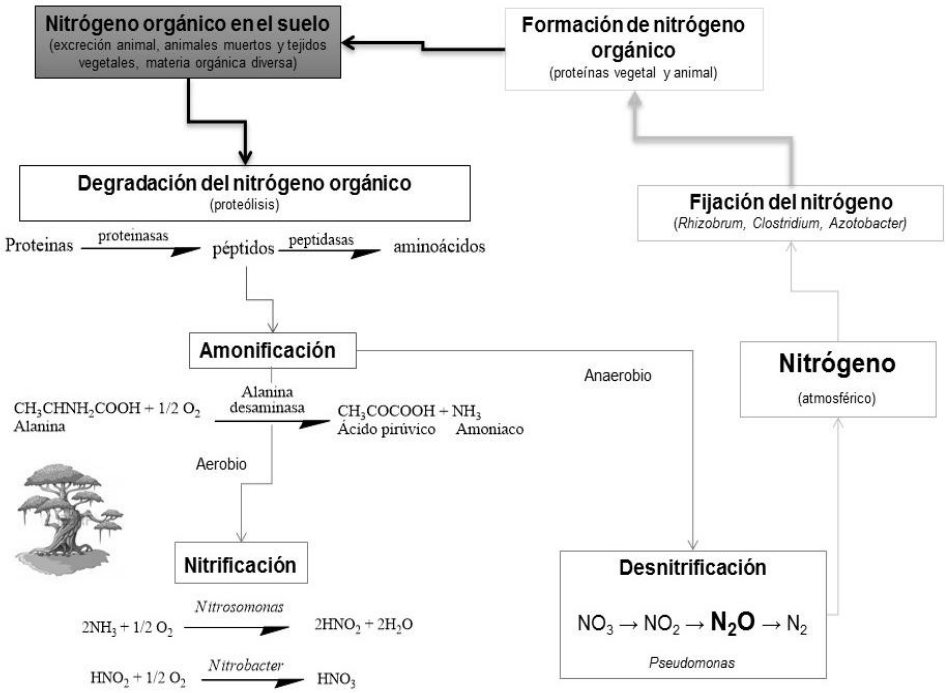


Figura 3. Transformación del nitrógeno orgánico e inorgánico por medio de los procesos de nitrificación y desnitrificación en el suelo (comunicación personal).

Ruta aerobia: Proceso de nitrificación

La nitrificación se define como la oxidación biológica del amonio (NH_4^+) a nitrato (NO_3^-) con nitrito (NO_2^-) como un producto intermediario (Figura 3) (Bremner, 1997). La nitrificación ocurre en dos partes. En la primera parte el amonio es oxidado a nitrito (Ecuación 1). En este paso los microorganismos predominantes que pueden oxidar el amonio a nitrito son *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* y *Nitrosovibrio*. En el segundo paso en el proceso de nitrificación, el nitrito es oxidado a nitrato por bacterias como *Nitrobacter* de acuerdo a la Ecuación 2 (Osman, 2013).

$$NH_3 + O_2 \rightarrow NO_2^- + 3H^+ + 2e^- \quad Ecuación\ 1$$

$$NO_2^- + H_2O \rightarrow NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \quad Ecuación\ 2$$

La concentración de amonio es generalmente baja en los suelos agrícolas, debido a que el amonio producido por la mineralización de la materia orgánica del suelo es utilizado por los microorganismos y las plantas. La nitrificación es muy limitada en las condiciones naturales del suelo, sin embargo, se convierte en el proceso más activo en los suelos a los que se les aplican fertilizantes que contienen urea y amonio, o donde se aplica materia orgánica regularmente (Nishio y Fujimoto, 1990).

Ruta anaerobia: desnitrificación en el suelo

La desnitrificación se ha considerado durante mucho tiempo como un proceso estrictamente anaerobio, pero ahora se sabe que también puede ocurrir en ambientes aparentemente aerobios porque muchos microorganismos desnitrificantes (ej. *Pseudomonas, Achromobacter, Bacillus,* y *Micrococcus*) son capaces de producir óxido nitroso (N_2O) en un amplio intervalo de concentraciones de oxígeno (Khalil et al., 2004).

La desnitrificación es la reducción gradual de NO_3^- a nitrógeno elemental (N_2) generando varios productos intermediarios ($NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$), esta reacción se lleva a cabo por microorganismos desnitrificantes predominantemente heterotróficos que en su mayoría son bacterias y que son anaerobios facultativos capaces de utilizar NO_3^- como aceptor final de electrones en lugar de oxígeno (O_2) en condiciones anaerobias. Sin embargo, cuando hay presencia de oxígeno (condiciones aerobias) la reducción del nitrato no es llevada a cabo y predomina la nitrificación (Wrage et al., 2001). La generación de N_2O puede ocasionar un impacto importante en el medio ambiente ya que es considerado un gas de efecto invernadero por su potencial de calentamiento global en 100 años el cual es aproximadamente 320 veces más fuerte que el del dióxido de carbono. El N_2O en el ambiente puede reaccionar en la estratosfera con el oxígeno atómico formando óxido nítrico, el cual induce la destrucción del ozono estratosférico (Wrage et al., 2001).

1.4 El agua en el suelo

El suelo es una reserva importante de agua y tiene la función de absorber, retener y suministrar agua además de transformar las lluvias o la nieve en un suministro continuo de agua para el crecimiento vegetal en los ecosistemas terrestres. Además, funciona como transporte de compuestos naturales (ácidos orgánicos, arcilla, agua, etc.) y antropogénicos (fertilizantes, residuos, pesticidas, etc.), dichos compuestos presentes en los ecosistemas terrestres son controlados por la dinámica del agua en el suelo. En consecuencia, el agua del suelo es un factor ecológico de gran importancia por lo que resulta fundamental determinar los volúmenes que el suelo puede contener, así como qué proporción de esta agua se encuentra disponible para las plantas (Thompson, 1952). El agua puede fluir hacia arroyos, ríos o puede ser absorbida por el suelo. Aunque el suelo es sólido, existen huecos entre las partículas que lo conforman, estos huecos son llamados poros y el agua puede fluir por estos. En estos huecos o poros el agua puede quedar retenida durante periodos largos de tiempo, permitiendo que las plantas absorban los nutrientes que transporta. Según el tamaño y la forma de los poros, el suelo tendrá mayor o menor capacidad hídrica (Domingo-Santos et al., 2006).

Una estimación de la capacidad hídrica del suelo muy utilizada es el parámetro de capacidad de retención de agua (CRA). La CRA del suelo depende de la profundidad del suelo, el volumen de los poros o espacios y la proporción de los vacíos que retienen agua contra el empuje de la fuerza de gravedad. En un suelo arenoso hay, por lo general, un volumen total relativamente grande de poros o espacios entre las partículas minerales grandes, pero la mayoría de los poros son tan grandes que el agua de lluvia drena a través de ellos y relativamente poca es retenida dentro del perfil. En suelos arcillosos puede ser esperada la situación opuesta: puede haber una proporción grande de poros o espacios tan pequeños que el agua de percolación puede entrar, parcialmente bajo la acción capilar, el agua no puede drenar y puede solo ser movida por las raíces de las plantas y/o la lenta evaporación dentro de cualquier espacio lleno de aire dentro del suelo. En suelos arcillosos muy compactos, tanto la entrada como la salida del agua pueden ser muy lentas (Calegari et al., 1998). Estas condiciones del suelo promueven un ambiente anaerobio.

El volumen total de agua retenida por unidad de volumen del suelo variará de acuerdo no sólo con las dimensiones de las partículas de las fracciones de arena/limo/arcilla que constituyen el suelo, sino también con el tamaño de los poros entre las partículas. El contenido de humedad del suelo varía (además de la influencia del clima) con el tipo, la profundidad y la cantidad de materia orgánica del suelo. Para la óptima captación, percolación, almacenamiento y uso de la humedad del suelo, son importantes que estén presentes tres capacidades físicas: la capacidad de permitir que el agua entre (infiltración), la capacidad para permitir que el agua se mueva fácilmente a través del perfil (permeabilidad) y la capacidad para almacenar la humedad adquirida en la zona radical y liberarla a las raíces de la planta, (capacidad de retención del agua). Muchos poros interconectados de un amplio rango de dimensiones, particularmente en la superficie del suelo, maximizarán la infiltración y reducirán la escorrentía, incrementando el agua disponible en el suelo (Roth, 1985). De tal manera que la CRA puede ser determinante en el ambiente que predomina en el suelo, aerobio o anaerobio, suelos con una CRA de 40% tendrán predominantemente un ambiente aerobio. Y suelos con CRA > 60% predominarán ambientes anaerobios en los espacios de poro.

1.5 Gases con efecto invernadero

En los ciclos biogeoquímicos del carbono y nitrógeno (C y N) se generan compuestos que son considerados gases de efecto invernadero (GEI), tales como dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), óxido nitroso (N_2O). Estos gases, el ozono en la troposfera (O_3) y los compuestos clorofluorocarbonos (CFCs) provocan la degradación de la capa de ozono y con esto el aumento en la temperatura de la atmosfera y océanos generando como consecuencia el calentamiento global y el cambio climático (IPCC, 2007). Actuales emisiones de GEI son generadas por actividades antropogénicas como los cambios de uso de suelo en la agricultura y sistemas forestales, el desarrollo industrial y la expansión urbana, entre otras (Muñoz et al., 2010). La contribución de los suelos agrícolas en las emisiones de CO_2, N_2O y CH_4 es alrededor del 10 al 12% del total de las emisiones antropogénicas de GEI. Estás emisiones están dadas principalmente por todas las actividades de fertilización o enmiendas orgánicas (ej. adición de estiércol, compostas, residuos de cultivos y biosólidos entre otros) que se realizan en los suelos y bajo las actividades agrícolas (Muñoz et al., 2010).

A nivel mundial se han estimado alrededor de 32.2 millones de hectáreas de suelos agrícolas con una fertilización orgánica con dichos residuos. Oceanía, Europa y América Latina son las regiones con las mayores superficies de suelo agrícola fertilizado con enmiendas orgánicas (Thangarajan et al., 2013). La adición de diferentes enmiendas orgánicas puede contribuir a la lixiviación de NO_3^- a mantos acuíferos y a las emisiones de GEI. Estas emisiones pueden resultar de la descomposición aerobia y anaerobia de la materia orgánica cuando entra a los ciclos biogeoquímicos. Existen reportes donde se ha observado que al agregar residuos agrícolas en la superficie del suelo, tales como el rastrojo de caña, se aumentan las emisiones de CO_2 y N_2O (Carmo et al., 2012; Oliveira et al., 2013). Como ejemplos de emisiones de GEI en las actividades agrícolas, se sabe que la fertilización química tiene una alta emisión de N_2O, seguido de la quema de biomasa (CH_4 y N_2O), arrozales inundados (CH_4) y adición de estiércol (Tabla 1). Mientras que otras enmiendas tales como la aplicación de efluentes o aguas residuales de azúcar de caña han sido reportados con emisiones de 310,000 Gg CO_2 equivalente, lo cual representa 2.5 veces menos emisiones que la fertilización química.

1.6 Aplicación de efluentes o aguas residuales al suelo

El aumento constante de la cantidad de agua utilizada y de aguas residuales producidas por las comunidades urbanas y las industrias de todo el mundo plantea problemas potenciales para la salud y el medio ambiente. Debido a esto los países están buscando métodos seguros, inocuos para el medio ambiente y eficaces en función de los costos, para depurar y eliminar las aguas residuales. Una alternativa a esta problemática es la utilización de las aguas residuales urbanas (tanto de los efluentes doméstico como industriales) para el riego de bosques, plantaciones forestales, zonas verdes, áreas para el esparcimiento y suelos agrícolas (Braatz y Kandiah, 1996).

Tabla 1. Generación de gases efecto invernadero en suelos por la adición de diferentes productos en las actividades de agricultura.

Actividad	[c] Emisiones (Gg de CO_2-eq)
[a] Fermentación entérica	2’079,915
[a] Suelos agrícolas	1’575,725
[a] Estiércol depositado en el suelo	829,957
[a] Fertilización química	771,869
[a] Cultivos de arroz	521,991
[b] Vinazas de alcohol de caña	310,000
[a] Gestión de estiércol	200,476
[a] Residuos de cultivos	193,030
[a] Estiércol aplicado al suelo	186,505
[a] Cultivación de suelos agrícolas	65,498
[a] Quema de residuos agrícolas	21,010

[a] FAO (2014); [b] Goncalves de Oliveira et al. (2013); [c] Suma de emisiones de CO_2, N_2O y CH_4.

La práctica de regar suelos agrícolas con aguas residuales va en aumento, especialmente en las zonas áridas y semiáridas, tanto de los países en desarrollo como en los desarrollados. Algunos autores han sugerido que el uso de aguas residuales para el riego es considerado como una forma de abordar el desequilibrio entre la demanda de agua y suministro de agua. Estudios sobre la irrigación del suelo con aguas residuales han demostrado efectos negativos sobre las propiedades fisicoquímicas del suelo (ej. incremento en la capacidad de intercambio catiónico (CIC), aumento en la materia orgánica, disminución de nutrientes (K, P, N y salinidad entre otras) y microbiológicas (ej. incremento en la biomasa de hongos, bacterias y arqueas en el suelo, formación de biopelículas las cuales disminuyen la conductividad hidráulica) del suelo. Los cuales influyen en la fertilidad y productividad de los suelos agrícolas (Becerra-Castro et al., 2015).

El origen de las aguas residuales industriales es muy variable y de la misma forma su contenido de nutrientes o compuestos. Pero aquellas con alto contenido de materia orgánica son consideradas para ser irrigadas al suelo como fertilizantes, sin importar los efectos que puedan tener en el mismo, tal es el caso de las aguas residuales de la industria del tequila.

El tequila es una de las bebidas alcohólicas más famosas en México y a nivel mundial, cuyo consumo se incrementa año con año (Iñiguez et al., 2005). En México, específicamente en Jalisco la industria tequilera está presente y se ha recurrido a irrigar las aguas residuales (vinazas) de esta industria a campos agrícolas, esto debido a que los agricultores consideran benéfica la aplicación de dichas aguas al suelo por su alto contenido de materia orgánica entre otros nutrientes. Sin embargo, son pocos los estudios documentados a nivel de procesos que ocurren en el suelo (nitrificación, desnitrificación, etc.) y los cambios en la ecología microbiana que se pueden estar ocasionando por la irrigación de vinazas.

1.7 Vinazas de la industria del tequila

El *tequila* se obtiene a partir de una planta endémica conocida como *Agave tequilana* Weber var. Azul la cual tiene denominación de origen que comprende 181 municipios: de los cuales 125 son del Estado de Jalisco, 8 de Nayarit, 7 de Guanajuato, 30 de Michoacán y 11 de Tamaulipas (Iñiguez et al., 2005; Lamas-Robles, 2004). La producción de tequila genera dos principales residuos, el bagazo y las vinazas. Las vinazas son desechos líquidos que permanecen en el fondo del alambique después de la destilación del mosto de agave fermentado. Se ha estimado que por cada litro de tequila producido, se generan en promedio de 7 a 12 litros de vinazas (Marino-Marmolejo et al., 2015). Con esta base de cálculo, se estima que la producción de tequila en el 2014 generó 1.8×10^9 litros de vinazas (55% Alc. Vol.) (CRT, 2015).

1.7.1 Características de las vinazas tequileras

En la mayoría de las empresas tequileras, el bagazo se convierte en composta que se aprovecha en las plantaciones de agave, mientras que una mínima cantidad de vinazas se utiliza en el riego de las pilas de composta. Además, gran cantidad de vinazas no recibe tratamiento adecuado o completo para el cumplimiento de la normatividad vigente (NOM-001-SEMARNAT-1996 y NOM-002-SEMARNAT-1997) antes de ser descargadas en cuerpos de agua (ríos, arroyos, lagos, presas) y alcantarillado municipal o en suelos agrícolas (Iñiguez et al., 2005). Sobre todo las pequeñas y medianas empresas que no tienen recursos financieros para tratar sus efluentes, y descargan sus vinazas clandestinamente o las aplican en suelos agrícolas.

Las vinazas se caracterizan por su elevada concentración de materia orgánica de 35,000 a 60,000 mg/L como DBO; (60,000-100,000 como DQO) y un pH de 3 a 4, una alta concentración de sólidos suspendidos y disueltos, así como iones de potasio (K), calcio (Ca), y magnesio (Mg) (Linerio-Gil y Guzmán-Carrillo, 2004). Una elevada concentración orgánica compromete el oxígeno disuelto del agua limpia, cuando se descarga aguas residuales a cuerpos de agua, tal como sería el caso de las vinazas tequileras (López-López et al., 2010; Tchobanoglous et al., 1991). Además de incrementar la concentración de iones como potasio, calcio, y magnesio en el suelo, y aumentar temporalmente la capacidad de intercambio catiónico (Cabrera, 2007).

1.8 La aplicación de vinazas al suelo y sus efectos

Algunos reportes indican que la aplicación de las vinazas tequileras en suelos sin tratamiento alguno puede favorecer la presencia de organismos patógenos para algunos cultivos. Amador (2002) reportó que el uso de vinazas tequileras en riego de plantas de agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul) facilitó la presencia de bacterias fitopatógenas en plantas atacadas por *Fusarium oxysporum* y *F. solani*. Sin embargo, es escasa la literatura sobre el efecto de las vinazas tequileras en suelos, y es nula la información sobre su efecto en la generación de gases con efecto invernadero (GEI).

Al respecto, lo más estudiado ha sido sobre vinazas alcoholeras o de la industria de remolacha. Y aun cuando las vinazas comparten ciertas características (elevada carga orgánica como DBO y pH ácido), presentan otras muy particulares que les confieren propiedades diferentes a cada tipo de vinaza, como son el contenido de metales pesados; materia orgánica de difícil biodegradación (DQO) y la cantidad de fósforo total (Aparecida-Christofoletti et al., 2013). La irrigación de vinazas puede causar cambios físicos, químicos y biológicos en las propiedades del suelo entre otros problemas como la filtración a mantos acuíferos, acumulación de sólidos y materia orgánica (Figura 4).

Diferentes vinazas han sido utilizadas como fertilizantes en diferentes cultivos debido a sus elevadas cargas orgánicas y nutrientes. Sin embargo, Moraes et al. (2014) indicaron que no es muy claro el impacto ambientales que se generan cuando los suelos agrícolas son regados con vinazas. Los autores demostraron que la adición de vinazas generadas en la producción de alcohol de caña de azúcar (vinazas de caña de azúcar) al suelo incrementó el contenido de nitratos y estos se lixiviaron a los mantos acuíferos. Otros autores sugieren que la aplicación de vinazas de azúcar de caña al suelo podría tener diferentes efectos debidos a factores tales como la cantidad aplicada al suelo, tipo de suelo, la composición química del suelo, el tipo de cultivo, y las condiciones ambientales que intervienen en el proceso (Aparecida-Christofoletti et al., 2013). Además, la composición de las vinazas no se ha estandarizado para el uso en el riego del suelo, lo que hace que sea un problema ambiental debido a las variaciones en la composición de las vinazas.

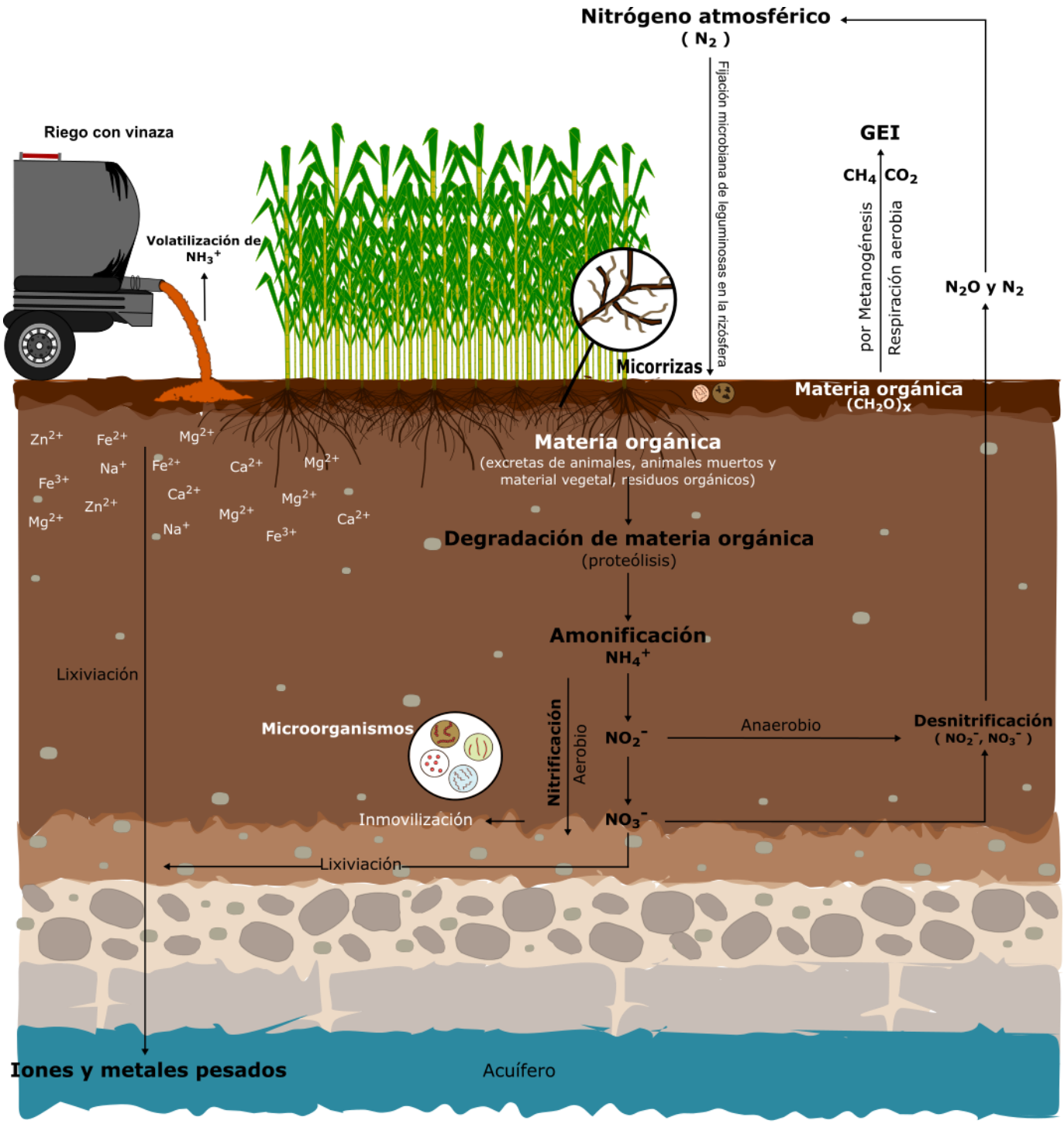


Figura 4. Representación esquemática de algunos procesos que podrían verse afectados por la adición de vinazas al suelo (comunicación personal).

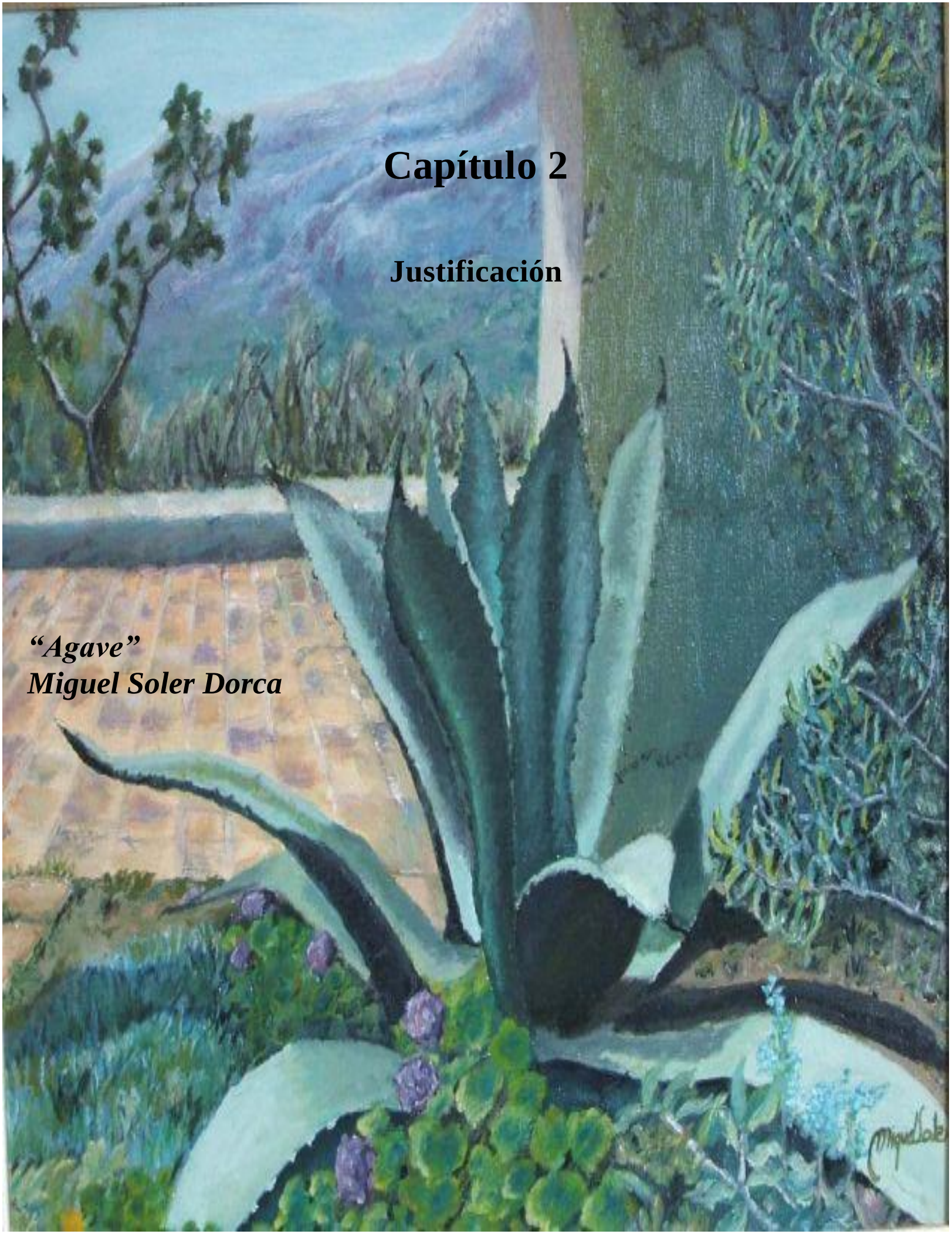
Por el contrario, estudios realizados por Laime et al. (2011) con respecto a la disposición de las vinazas de azúcar de caña al suelo, han reportado efectos benéficos sobre los cultivos y las propiedades físico-químicas de los suelos, tales como un aumento de la retención de la humedad, la porosidad, contenido de potasio (K^+), la conductividad eléctrica (CE), y la actividad biológica. Sin embargo, de acuerdo con Madejon et al. (2001), se pueden producir altas concentraciones de sales en el suelo y un riesgo potencial de salinidad cuando las vinazas de azúcar de caña se riegan por varios años.

Ribeiro et al. (2010) detectaron un aumento de la lixiviación de plomo en presencia de las vinazas en el suelo, en particular por los compuestos orgánicos solubles, que forma el complejo soluble de la materia orgánica con el plomo. Parnaudeau et al. (2008) sugirieron que el riego con vinazas en cultivo de caña de azúcar promovió la inmovilización de N al comienzo de la incubación en experimentos de laboratorio. Sin embargo, el tiempo en que el N estará disponible en el suelo no está indicado. En general, existe escasa información sobre la mineralización del nitrógeno de las vinazas de caña de azúcar o de la disponibilidad de nitrógeno para las plantas.

Además algunos autores reportaron que la aplicación de vinazas de la producción de etanol de remolacha (vinazas de remolacha) al suelo a diferentes dosis aumentó la densidad aparente, sodio intercambiable y la lixiviación de iones metálicos tales como el zinc y el cobre, con una reducción de la biomasa microbiana, la respiración del suelo, las actividades de deshidrogenasa, ureasa y fosfatasa y la estabilidad estructural (Madrid y Díaz-Barrientos, 1998; Tejada et al., 2007). Además, se ha reportado un aumento en el contenido de cationes monovalentes (Na^+, K^+) y ácidos fúlvicos con la adición de 5 a 10 toneladas vinazas ha^{-1}, de suelo lo que indica una mineralización de la materia orgánica (Tejada et al., 2007).

Por otro lado, Madejón et al. (2001) indicaron que las vinazas de remolacha tienen un gran potencial en la agricultura, debido a su alto contenido de materia orgánica (MO), N y K. Sin embargo, su potencial se reduce debido a una alta concentración de Na^+ (21 g Kg^{-1}), que es responsable de la erosión del suelo, disminución de la biomasa microbiana y productividad de los cultivos. Otros autores han sugerido que el uso de vinaza de remolacha en un proceso de compostaje con otros residuos sólidos podría resolver estos problemas ya que se ha demostrado que puede ser adecuado para la mineralización del nitrógeno (NH_4^+, NO_3^-) observándose efectos positivos sobre el rendimiento de los cultivos (Robles-González et al., 2012).

Estos estudios son sólo algunos trabajos con vinazas, principalmente de la industria alcoholera de caña o de remolacha, sin embargo, con vinazas tequileras los efectos sobre los efectos de las vinazas tequileras sobre procesos tales como la mineralización de nutrientes, i.e. C, N; su aporte en la generación de gases con efecto invernadero (CO_2, N_2O y CH_4), así como el efecto en las poblaciones bacterianas del suelo no ha sido documentado.



Capítulo 2

Justificación

"Agave"
Miguel Soler Dorca

2 Justificación

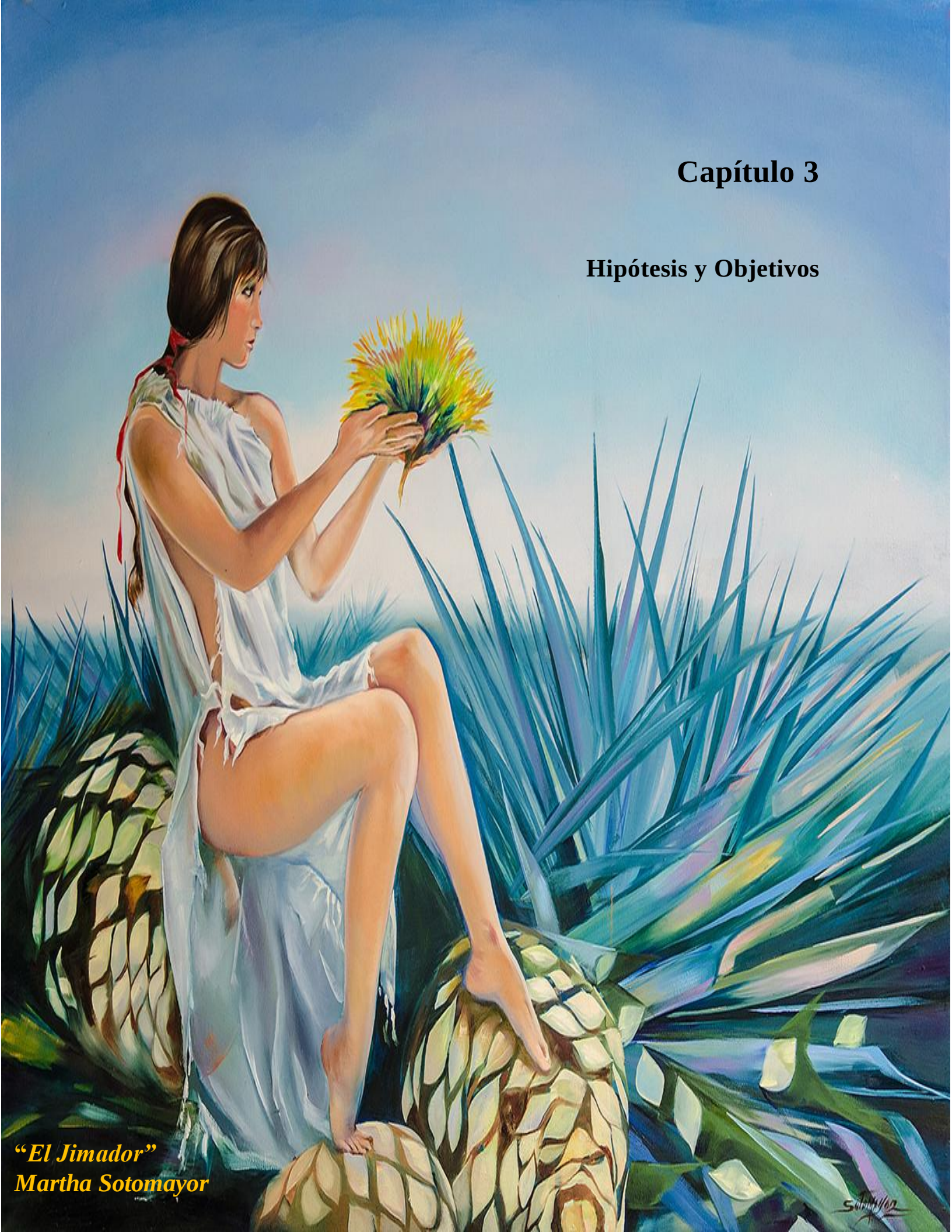
La alta generación alta de vinazas tequileras (2,424 millones de litros en el 2014,) (CRT, 2015), provoca problemas de manejo, tratamiento y disposición final de esta agua residual. Aunque se tienen diferentes procesos de tratamiento de vinazas, los tratamientos propuestos son cotosos para las pequeñas y medianas empresas, lo que obliga a estas industrias a buscar otras alternativas más económicas una de ellas es el riego de suelos agrícolas con vinazas. Actualmente se realiza dicha práctica y no se conocen los efectos que estas vinazas pueden tener en los ciclos biogeoquímicos del suelo, o que afectaciones o beneficios pueden generar en el suelo.

Por tal motivo, esta investigación busca evaluar los efectos de las vinazas tequileras cuando son utilizadas para la irrigación de suelos agrícolas, sobre la mineralización de nutrientes como carbono y nitrógeno, y su aporte en la generación de gases efecto invernadero (CO_2, N_2O y CH_4).

.

Capítulo 3

Hipótesis y Objetivos



"El Jimador"
Martha Sotomayor

3 Hipótesis y objetivos

3.1 Hipótesis

Tomando en cuenta los elementos que componen a las vinazas tequileras, es posible que:

1. La adición de materia orgánica contenida en las vinazas tequileras favorecerá la mineralización de nutrientes en el suelo durante el proceso de nitrificación.

2. El proceso de desnitrificación y la generación de gases con efecto invernadero (CO_2, N_2O y CH_4) aumentará con la adición de vinazas al suelo.

3.2 Objetivos

General

Investigar los cambios en los procesos de mineralización de carbono y nitrógeno y la generación de gases efecto invernadero en un suelo agrícola.

Específicos

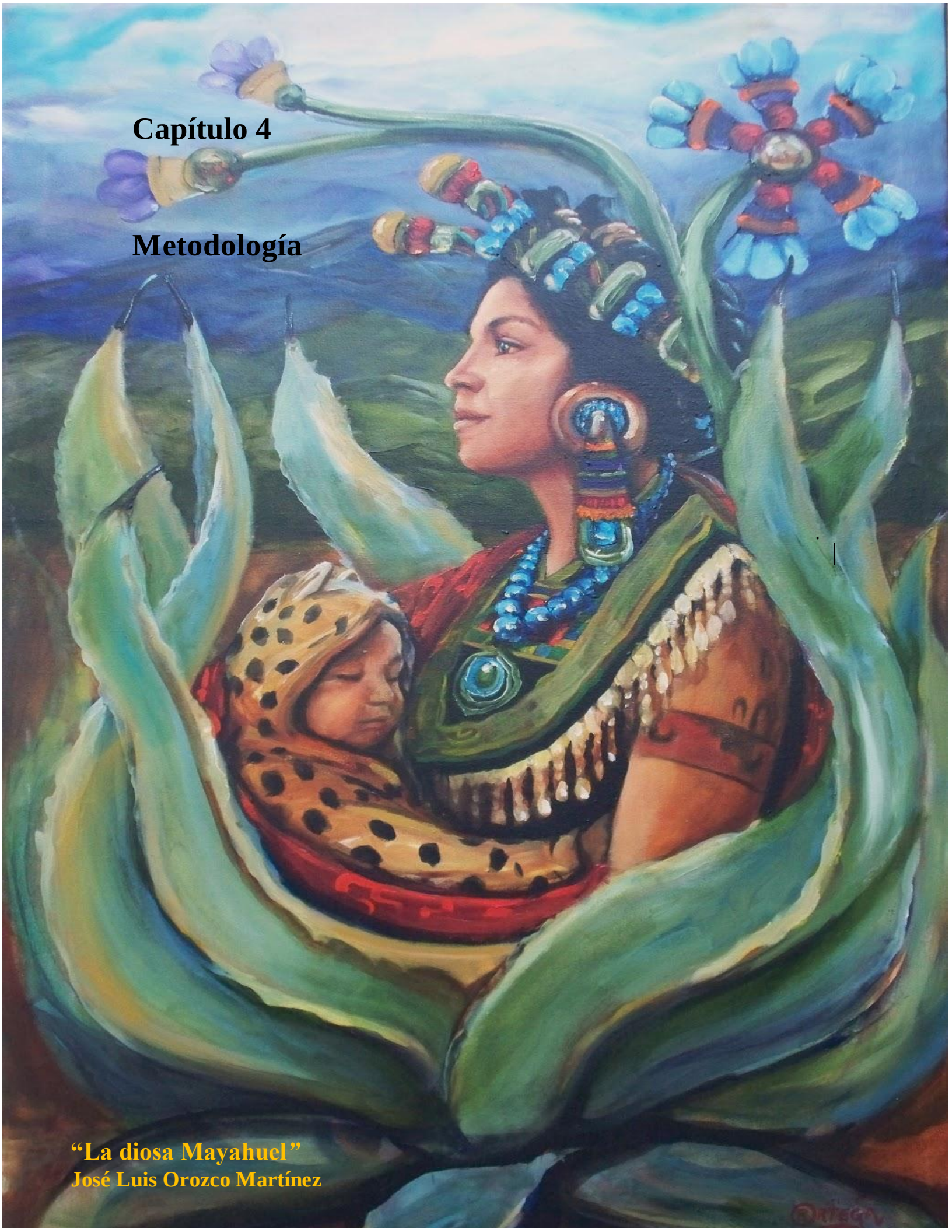
1. Evaluar el efecto de las vinazas tequileras sobre la mineralización de carbono y nitrógeno en el proceso de nitrificación bajo diferentes condiciones de humedad de un suelo agrícola.

2. Determinar el efecto de la aplicación de vinazas en el proceso de desnitrificación y la tasa de generación de gases efecto invernadero (CO_2, N_2O y CH_4) en diferentes condiciones de humedad.

3. Identificar las bacterias y arqueas presentes en el suelo de estudio con y sin el riego de vinazas tequileras para correlacionar su presencia con los procesos de nitrificación y desnitrificación.

Capítulo 4

Metodología



“La diosa Mayahuel”
José Luis Orozco Martínez

4 Metodología

Como primera parte de la investigación se evaluó los procesos del suelo como la mineralización del carbono y nitrógeno (nitrificación) y la producción de gases con efecto invernadero (desnitrificación). Además de las poblaciones bacterianas y arqueas presentes en el suelo que ha sido regularmente irrigado con vinazas tequileras (SV) y donde presuntivamente no se ha irrigado con vinazas (suelo control SC) que se describen posteriormente.

4.1 Selección del sitio, muestreo de suelos y caracterización

El sitio de muestreo fue elegido por ser un suelo agrícola y por su cercanía con una tequilera que descarga regularmente sus vinazas en este sitio. También, se tenía el reporte de que sólo una parte del sitio es regada con vinaza (Suelo vinaza SV) mientras que otra parte no se ha regado con vinazas (Suelo control SC). Este sitio está localizado en el municipio de "El Arenal", Jalisco (20º46'7" N y 103º41'18"O) y estaba cultivado con caña (*Saccharum officianarum*) en la etapa final del cultivo y casi a punto de la zafra. El muestreo se realizó siguiendo la metodología descrita por la NOM-021-RECNAT-2000, muestreando 49 puntos en el suelo vinaza (2.4 ha) y 21 en el suelo control (1.8 ha). Los suelos fueron separados en tres campos para cada suelo y manejados por separado para mantener una n=3 por cada muestra de suelo y por triplicado, dando en total una n=9.

El suelo muestreado fue homogenizado y tamizado en maya de 5 mm de apertura de trama y posteriormente se realizó un pre-acondicionamiento del suelo para reactivar la flora microbiana del suelo. Éste consistió en ajustar el suelo a una capacidad de retención de agua (CRA) del 40%, posterior a esto el suelo se incubó a temperatura ambiente durante 4 días con una trampa de NaOH 1M para capturar el CO_2 producido y con agua para mantener las condiciones aerobias (Ramirez-Fuentes et al., 2002).

4.2 Mineralización de carbono (C) y nitrógeno (N) en el proceso de nitrificación

Se colocaron 20 g de suelo vinaza y suelo control pre-acondicionado en unidades de microcosmos a diferentes CRA (40, 80 y 100 %) (Tabla 2). La CRA fue ajustada con agua destilada o vinaza de acuerdo a los tratamientos establecidos para los experimentos indicados en la Tabla 2. Los microcosmos se colocaron con 10 mL de agua destilada en el ambiente y un vial con 20 mL de NaOH 1M como trampa para capturar CO_2, se tuvo un *n* = 9 para cada CRA. Las unidades fueron incubadas durante 70 días a temperatura ambiente y en obscuridad, fueron abiertos para su aireación durante 3 minutos cada semana para evitar condiciones anaerobias (Luna-Guido et al., 2003). Se tomaron al azar 9 unidades de cada tratamiento y CRA en los días 0, 7, 14, 28, 56 y 70, para determinar el contenido de amonio (NH_4^+) nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-). A las muestras de suelo de cada tratamiento se les agregó K_2SO_4 0.5 M en una relación 1:5, esto para extraer los iones de NH_4^+, NO_2^- y NO_3^- y posteriormente determinar colorimétricamente su concentración en un espectrofotómetro San Plus System SKALAR (Mulvaney, 1996).

Tabla 2. Tratamientos para nitrificación y desnitrificación.

CRA	Riego con:	Suelo	
		Control	Vinaza
40	Agua	SC-40-A	SV-40-A
80	Agua	SC-80-A	SV-80-A
100	Agua	SC-100-A	SV-100-A
40	Vinaza	SC-40-V	SV-40-V
80	Vinaza	SC-80-V	SV-80-V
100	Vinaza	SC-100-V	SV-100-V

4.3 Producción de gases con efecto invernadero

La evaluación de la tasa de generación de gases con efecto invernadero (CO_2, N_2O y CH_4) por la aplicación de vinazas tequileras al suelo, se realizó en microcosmos sellados con botellas serológicas y tapa de metal, ajustando la CRA a 40, 80 y 100% con vinazas o agua según el tratamiento (Tabla 2). Los gases CO_2 y N_2O se midieron en el espacio de cabeza de los microcosmos en los días 0, 1, 2, 3, y 7, llevando la muestra a un cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones (ECD) Agilent (4890D, Agilent Technologies). Se utilizó una columna J&W Scientific GS-Q con 30 m de longitud y 520 μm de diámetro interno, utilizando como gas acarreador el N_2 a un flujo de 5 mL min^{-1}. Las temperaturas del puerto de inyección, el detector y la columna en el horno fueron de 100 °C, 225 °C, y 35 °C, respectivamente. Para cada análisis se inyectó una alícuota de 1 mL utilizando una jeringa de vidrio con sello de Teflón (Hamilton®, USA).

Además se determinó la concentración de metano (CH_4), se tomó 1 mL de muestra de gas del espacio de cabeza de cada microcosmos el cual fue analizado en un cromatógrafo con detector de ionización de flama (FID) en una columna PORAPAK Q80/10012 ×1/8´ ×0.085´con una temperatura del detector de 310 ºC, puerto de inyección de 100 ºC y el horno a 32 ºC, utilizando Helio como gas acarreador a un flujo de 25 mL min^{-1} y siguiendo el método propuesto por Ruiz-Valdiviezo et al. (2010).

Simultáneamente se realizó un experimento similar al anterior, adicionando 0.1% de acetileno (control positivo) a cada microcosmos ya que se ha reportado que inhibe la nitrificación (Herrmann et al., 2007). Esto se realizó para cuantificar la emisión de GEI sólo por efecto de la ruta de la desnitrificación.

4.4 Identificación de bacterias y arqueas en suelos regados con vinazas y agua

Para evaluar las poblaciones bacterianas presentes en los suelos de estudio, se utilizaron los suelos muestreados, es decir suelo donde se tuvo el registro que aparentemente no se ha regado con vinazas tequileras (suelo control), y otro el cual fue regado con vinaza (suelo vinaza), esto para evaluar las poblaciones bacterianas presentes al inicio de la experimentación y apoyar los resultados obtenidos. Cada muestra de suelo fue dividida en tres sub-muestras para su extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) descrita posteriormente.

4.4.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se siguió el procedimiento indicado en el kit para extracción de material genómico de suelo (PowerSoil® DNA Isolation Kit, MOBIO Laboratories, Inc.). La integridad del ADN extraído fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1.3% con solución amortiguadora de TAE 1X teñido con 200µL de solución 1X de colorante de ácidos nucleicos GelRed™ 10,000X (Biotium). La corrida del ADN se realizó a 90 volts durante 65 minutos, se utilizó un marcador de 1 kilo base (Fermentas) para confirmar el tamaño del fragmento obtenido. Para visualizar la integridad del ADN_g, se utilizó un transluminador de luz UV (UVP LLC, Upland, California, USA) finalmente el ADN eludido se almacenó a –20 ºC hasta su uso.

4.4.2 Amplificación por reacción de la polimerasa (PCR).

El ADN extraído fue utilizado como base para la amplificación de un fragmento de la región V3 hipervariable del gen ARNr 16S de bacterias vía PCR punto final. La mezcla de reacción se llevó a 50 µL, utilizando 2 µL de ADN genómico garantizando una concentración mínima de 100 ng μL^{-1}, iniciador directo C356F, enriquecido con pinza de GC (5´-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCCCCTA CGGGAGGCAGCAG-3´) el iniciador inverso 517R (5′-ATTACCGCGGCTG CTGG-3′) a 0.5 µM (Muyzer et al., 1993). 1 U μL^{-1} de One Taq® polimerasa ADN enriquecida con GC buffer (contenida en 80 mM Tris-SO_4, 2 mM $MgSO_4$ y 20 mM $(NH_4)_2SO_4$) (*New England*

Biolabs). Las condiciones de reacción fueron: etapa inicial de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, temperatura inicial de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, temperatura de alineamiento 59°C por 45 segundos y extensión a 68°C, por 1 minuto, hasta completar 35 ciclos, finalizando con una extensión final a 68 °C por 5 minutos. . La amplificación se realizó en un termociclador para PCR punto final (ProFlex™ PCR System, Thermo Fisher scientific). El tamaño esperado de amplificación del fragmento fue aproximadamente 200 pb del gen 16S.

También se realizaron PCR´s para detectar la presencia de arqueas donde se utilizaron los iniciadores 787F (5′-ATTAGATACCCSBGTAGTCC -3′) y 1059R (5′-GCCATGCACCWCCTCT -3′) dentro de las regiones V5 y V6 del 16S ARNr (Yu et al., 2005). La amplificación se realizó en el termociclador para PCR punto final (ProFlex™ PCR System, Thermo Fisher scientific). Las condiciones para esta reacción fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 10 minutos, desnaturalización a 94 °C por 10 segundos, alineamiento a 58 °C por 30 segundos, extensión a 72 °C por 30 segundos y una extensión final de 72°C por 5 minutos. El tamaño esperado de amplificación del fragmento fue de aproximadamente 273 pb del gen 16S.

El ADN amplificado por PCR se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.3% con TAE 1X y teñido con 200µL de solución 1X de colorante de ácidos nucleicos GelRed™ 10,000X (Biotium). La corrida se realizó a 90 V por 65 min, usando marcador de 100 pb (*Sigma-Aldrich*) para confirmar el tamaño del fragmento amplificado. Para la visualización de los productos amplificados se siguió la metodología descrita anteriormente.

4.4.3 Análisis por DGGE

Al producto de PCR de estas muestras se les realizó electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE, por sus siglas en inglés), en un sistema universal de detección de mutaciones (Biorad, Hercules, California, USA). Los productos de PCR fueron cargados en un gel de poliacrilamida al 10% de 16 cm x 16 cm x 1 mm, el cual fue preparado usando

40% acrilamida/bis-acrilamida (39:1) (Sigma-Aldrich), 50x solución TAE (2 M Trizma base, 50 mM EDTA, 1 M ácido acético), urea ultra pura (Sigma-Aldrich); formamida destilada (Sigma-Aldrich) y dH_2O, la solución de gradiente de desnaturalización 25-55% fue preparada con 2.0 mL de formamida y 2.1 g de urea para la baja concentración. 4.4 mL de formamida y 4.6 g de urea para la alta concentración. Las soluciones alta y baja se les agregó 0.4 mL TAE 50X y 4 mL de acrilamida /bis-acrilamida llevando a un volumen final de 20 mL con dH_2O. La electroforesis se corrió a 60°C y con un voltaje constante de 70 volts durante 14 horas. Después de la electroforesis el gel se tiño usando colorante de ácidos nucleicos GelRed™ 10,000x (Biotium) al 0.05% durante 20 minutos aproximadamente. El gel se visualizó en un transluminador con luz UV (UVP LLC, Upland, California, USA). Esta etapa se realizó para determinar las poblaciones microbianas dominantes e ilustrar la diversidad de comunidades microbianas por la diferencia e intensidad de bandas observadas (poblaciones tentativas) entre las muestras de ADN de los suelos con y sin la aplicación de vinazas. La diferencia de gradientes permite una separación adecuada de bandas debido a las diferencias en sus secuencias, separándose a lo largo del gel por las concentraciones de desnaturalización, posteriormente se realizó un escrutinio y selección de las bandas de mayor intensidad y definición para extraerlas del gel por corte.

Las bandas cortadas del gel desnaturalizante se re-suspendieron en microtubos con 100 µL de buffer de extracción (Tris HCl 10 mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1.5mM, Triton-X 100 0.1% a pH 9) Esta mezcla se llevó a una temperatura de 95 °C por 20 minutos, en un termobloqué después de este tiempo fueron centrifugados por 5 minutos a 12,000 g para recuperar el ADN psteriormente se re-amplificó el ADN vía PCR. La mezcla de reacción se llevó a 50 µL, utilizando 2 µL de la solución anterior; iniciador directo 356F (5′-CTACGGGAGGCAGCAG-3′), iniciador inverso 517R (5′-ATTACCGCGGCTG CTGG-3′) a 0.5 µM, 1 U μL^{-1} de One Taq® polimerasa ADN estándar (20 mM Tris-HCl, 1.8 mM $MgCl_2$, 22 mM NH_4Cl y 22 nM HCl) (*New England Biolabs*). Se comprobó la integridad en un gel de agarosa 1.3% con solución amortiguadora de TAE 1X teñido con 200µL de solución 1X de colorante de ácidos nucleicos GelRed™ 10,000X (Biotium). La corrida del ADN se realizó a 90 volts durante 65 minutos con marcador de 100 pb (*Sigma-Aldrich*)

para confirmar el tamaño del fragmento amplificado. El gel se visualizó por medio de un transluminador de luz UV (UVP LLC, Upland, California, USA). Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (PROMEGA) posteriormente fueron enviados a secuenciación por el método de Sanger con terminadores fluorescentes a los laboratorios de clonación molecular Macrogen (Macrogen, Rockville, USA). Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el software Chromas Lite 2.1.1 (Technelysium, South Brisbane, Queensland, Australia) las secuencias de los microorganismos identificados fueron comparadas con las reportadas en la base de datos del GenBank, observando la máxima similitud entre identidad, cobertura y valor E, utilizando la herramienta de función básica de búsqueda local de alineamiento (BLAST por su siglas en inglés) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) y la base de datos de secuencias ribosomales (*Ribosomal Database Project)* (http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp) para la identificación de arqueas y bacterias basadas en el criterio de buena intensidad y alta definición las cuales representan un predominio relativo de una población dada con respecto a las bandas menos definidas y claras obtenidas del análisis molecular por DGGE.

4.5 Análisis fisicoquímicos

4.5.1 pH

El pH fue medido en una mezcla de suelo con agua en una relación 1:2 p/v, la cual se agitó durante 3 a 5 minutos para después sumergir el electrodo del potenciómetro (HANNA HI 3512) durante un minuto y esperar a que la lectura se estabilizara. Para el caso de las vinazas el pH se midió directamente de la muestra (NOM-021-RECNAT, 2000).

4.5.2 Humedad

La humedad se determinó por el método gravimétrico, utilizando 10 g de suelo y colocándolos en una charola de aluminio, se secaron en una estufa a 120 °C durante 3 horas (NOM-021-RECNAT, 2000). Posteriormente fueron pesados y se calculó la humedad mediante la siguiente fórmula:

$$\%\ Humedad = \frac{material\ húmedo - material\ seco}{material\ húmedo} * 100$$

4.5.3 Cenizas

Las cenizas se determinaron mediante el siguiente procedimiento: después de calculada la humedad la muestra restante (con el peso registrado) se colocó en una cápsula de porcelana previamente llevada a peso constante, la cápsula se metió a la mufla a una temperatura de 550 a 600 °C durante 3 horas. Posteriormente las cenizas remanentes se pesaron y se calculó el porcentaje de ceniza por diferencia de los pesos registrados.

4.5.4 Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica (CE) se determinó mediante una mezcla de suelo y agua desionizada en una relación 1:5 p/v, la cual fue filtrada al vacío y al extracto se le determinó la CE al introducir el electrodo del conductímetro HANNA HI 3512 registrando la lectura después de que se estabilizó. Para las vinazas la lectura de la CE fue directamente de la muestra (NOM-021-RECNAT, 2000).

4.5.5 Carbono Orgánico Total

El carbono orgánico total (COT), los sólidos volátiles (SV) y materia orgánica en el suelo se determinó por el método de calcinación a 550-600ºC, en el cual el suelo (10 g) en base seca se colocó en una cápsula de porcelana y posteriormente se calcinó durante 3 horas. El porcentaje de carbono orgánico y sólidos volátiles fueron determinados mediante las siguientes formulas (NMX-FF-109-SCFI-2007):

$$\%Sólidos\ volátiles = \frac{(gramos\ de\ la\ muestra - gramos\ de\ cenizas)}{gramos\ de\ la\ muestra} * 100$$

$$\%\ Carbón\ orgánico\ total = \frac{\%sólidos\ volátiles}{1.8}$$

$$\%\ Materia\ Orgánica\ = 100\% - \%Ceniza$$

4.5.6 Textura

La textura en del suelo fue determinada mediante el método de bouyoucos. Se pesaron 100 g de suelo, se les adicionó agua hasta cubrir la superficie y se agregó 5 mL de Hexametafosfato de sodio 0.08 M. La mezcla se llevó a un agitador mecánico para homogenizar y posteriormente la muestra se pasó a una probeta de 1000 mL y se introdujo el hidrómetro primeramente a los 40 segundos para medir las partículas de diámetro mayores a 0.05 mm y después a las 2 horas para partículas de diámetro mayores de 0.002 mm (NOM-021-SEMARNAT-2000). La textura fue determinada mediante la lectura del hidrómetro el cual se corrigió mediante tablas de corrección de temperatura que indica la norma y mediante fórmulas:

$$Lectura\ 40\ segundos\ \times 2 = \%\ Arcilla + Limo$$

$$Lectura\ 2\ horas\ \times 2 = \%Arcilla$$

$$(100 - \%\ Arcilla) + Limo = \%\ Arena$$

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

Obteniendo los porcentajes se comparó con el triángulo textural (Figura 5)

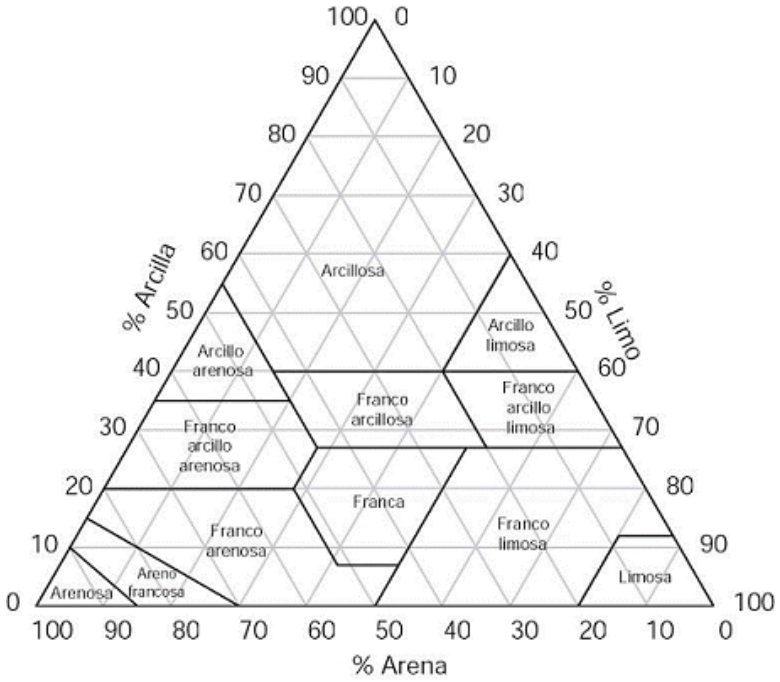


Figura 5. Triangulo textural (FAO, 2014).

4.5.7 Capacidad de Intercambio Catiónico

La determinación de la capacidad de intercambio catiónico (CIC) en el suelo consistió en colocar 2 gramos de suelo en base seca al cual se le agregó 25 mL de $BaCl_2$ 0.6 M y se centrifugó separando el suelo, al centrifugado se le añadió 25 mL de solución de sulfato magnésico (aproximadamente 0.1 N) y se centrifugó nuevamente. De este último se tomaron 10 mL de solución sobrenadante transparente y se diluyeron a 100 mL con H_2O destilada. Finalmente se le adicionó solución tampón (que contenía cloruro amónico 1 N e hidróxido de amonio 1 N) y 6 gotas de negro de ericromo T (0.2%) y se valoró con solución de EDTA 0.05 N (Uehara y Gillman, 1981).

$$CIC = (M - N) * \frac{0.05 * 2.5 * 100}{P} = (M - N) * \frac{12.5}{P}$$

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.

4.5.8 Nitrógeno inorgánico

Para determinar el nitrógeno inorgánico (NO_3^-, NO_2^-, NH_4^+) durante la caracterización del suelo se preparó un extracto 1:4 con 5 g de suelo con 20 mL de K_2SO_4 al 0.5 M. La mezcla fue agitada en un vórtex durante 5 min para disgregar el material y después se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min, al sobrenadante se le determinó NO_3^-, NO_2^- y NH_4^+.

Para medir el nitrógeno inorgánico en la vinaza, una muestra de vinaza se tomó directamente de la muestra liquida para realizar el análisis de nitritos, nitratos y amonio por espectrofotometría:

Nitritos (NO_2^-): Se midieron mediante el método colorimétrico (Sulfato Ferroso) de las pruebas de HANNA® método HI 93708-0. Del extracto del suelo o de la vinaza se tomaron 10 mL y se les adicionó el reactivo HI 93708 (Sulfanilamida y N-(1-naftil) etilendiamina) la presencia de nitritos en la muestra produce un color café verdoso del cual se determina su absorbancia en un espectrofotómetro HANNA® (HI 83200, RUMANIA) a 575 nm.

Nitratos (NO_3^-): Se midieron mediante el método espectrofotométrico reducción de cadmio de las pruebas de HANNA® (HI 83200, RUMANIA). Los nitratos se reducen a nitritos en presencia del cadmio. Los nitritos producidos de este modo reaccionan con el reactivo (EDTA en buffer amonio/amoniaco) hasta producir un compuesto naranja. La cantidad de color desarrollado es proporcional a la concentración de nitrato presente en la muestra acuosa. Del extracto de la muestra se tomaron 6 mL y se adicionó un reactivo HI 93728-0® (sulfanilanilamida, ácido fosfórico, N-(1-naftil) etilendiamina dihidroclorada). Se agitó y se dejó reposar por 5 min. La reacción entre el nitrato y el reactivo causa un color ámbar en la muestra la cual se midió su absorbancia a 525 nm en un espectrofotómetro HANNA ® para determinar su concentración de NO_3^{-1}.

Amonio (NH_4^+): Para determinar el amonio se tomó 10 mL de extracto y/o vinaza de la muestra a la cual se le agregó los reactivos HI 93715A-0 (alcohol polivinílico) y HI 93715B-0 (reactivo de Nesslers) del kit HANNA ®, los reactivos causan una coloración amarilla en la muestra, la cual absorbe luz a 420 nm en el espectrofotómetro HANNA ® (HI 83200, RUMANIA).

4.5.9 Metales

Los metales como cadmio, arsénico, mercurio, cromo, cobre, plomo, hierro, níquel y zinc fueron analizados de acuerdo a la NOM-117- SSA1-1994. La cual señala que las muestras (0.1 mg base seca) deben someterse a una digestión húmeda en un sistema de reflujo y agregar poco a poco la cantidad necesaria de ácido nítrico concentrado y calentar a 90 o 95 ºC durante 30 min o hasta que no se observen cambios en la digestión. Una vez realizada la digestión se dejó enfriar y se agregó una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico concentrados (1:1 v/v), posteriormente se calentó y se agregó más ácido nítrico concentrado gota a gota sobre las paredes del recipiente, hasta que el color obscuro de la solución desapareció. Las muestras se dejaron enfriar y se leyeron por espectrometría de emisión atómica con acoplamiento a inducción de plasma (ICP-AES, Perkin Elmer Optima 8300) por sus siglas en inglés (Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry). Las muestras para el análisis de metales pesados se enviaron a la unidad de servicios analíticos y metrológicos (USAM) del CIATEJ para su determinación con la técnica antes descrita.

4.5.10 Nitrógeno Total

La determinación de nitrógeno total por digestión involucró dos pasos: a) digestión de la muestra para convertir el nitrógeno a NH_4^+, y b) la determinación de NH_4^+ en el digestado. La digestión de la muestra se desarrolló por calentamiento de la muestra con ácido sulfúrico concentrado y mezcla de catalizadores (1 g de K_2SO_4, 100 g de $CuSO_4$, $5H_2O$ y 10 g de Selenio metálico) que promovió la oxidación de la materia orgánica y la conversión del nitrógeno orgánico a amonio. El amonio en la muestra digerida es determinado por titulación con un álcali (ácido bórico H_3BO_3) Las muestras para el análisis de nitrógeno total se enviaron a la unidad de servicios analíticos y metrológicos (USAM) del CIATEJ para su determinación (NOM-021-RECNAT, 2000).

4.5.11 Capacidad de Retención de Agua

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, posteriormente el cono con el suelo se colocó en un embudo y se le adicionó 100 mL de H_2O hasta saturación, dejándolo 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):

$$\% \, CRA = [peso\ final - (peso\ papel * 1.23) - \ (gr\ muestra * \frac{100 - \% \, Humedad}{100}) * \frac{100}{gr\ muestra * (100 - \% \, Humedad)}$$

4.5.12 Fósforo disponible

La concentración de fósforo disponible en el suelo se cuantificó mediante el método de ácido ascórbico- molibdato de amonio. En el cual se pesó 1 g de suelo y se le agregó 7 mL de solución extractora (NH_4F y HCl) y esta solución se filtró con papel Whatman® # 42. Al filtrado se le agregó 5 mL de H_2O destilada. A 10 mL de la solución anterior se le agregó 1.6 mL de reactivo combinado (que contenía H_2SO_4 5 N, Tartrato de K y Sb 0.005 M, molibdato de amonio 0.03 M y ácido ascórbico 0.1M) y posteriormente se leyó su absorbancia a 880 nm. La concentración de fósforo fue calculada con una curva estándar utilizando Na_3PO_4 como estándar a diferentes concentraciones (0, 2, 4, 6, 8, 10 mg P mL^{-1}) (NOM-021-RECNAT, 2000).

El fósforo disponible en las vinazas fue determinado como ortofosfatos: se midió mediante el método molibdato de las pruebas de HACH® método número 8048. El cual está basado en el método 365.2 de la USEPA y por el método 4500_P del Standard Method. 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 min. 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 midieron a 880 nm en un espectrofotómetro HACH® DR 500 para determinar su concentración de ortofosfatos .

4.5.13 Fósforo Total

El fósforo total se cuantificó mediante el método por digestión con agua regia (HNO_3 + HCl 1:3). Se utilizaron 500 mg de suelo, se agregó 10 mL de agua regia y se llevó a una digestión hasta sequedad. Al digestado se le agregó 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 bidestilada. De esta solución se tomaron 10 mL y se le agregaron 1.6 mL de reactivo cambiando y finalmente se leyó su absorbancia a 880 nm (NOM-021-RECNAT, 2000).

4.5.14 Carbono Orgánico Total en la vinaza

El carbono orgánico total (COT) en las vinazas se calculó mediante la técnica de 27604-45 método de alto rango *Test 'N tube de HACH®* la cual involucra la oxidación del carbono de la muestra a dióxido de carbón mediante la digestión con persulfato a una temperatura de 103 a 105 °C. El dióxido de carbono generado se mezcla en una solución indicadora de pH donde ésta es convertida a ácido carbónico. El color resultante que es medido a 598 nm es directamente proporcional a la concentración de carbono presente en la muestra.

4.5.15 Demanda química de Oxígeno

La demanda química de oxigeno (DQO) fue medida mediante el método de digestión de reactor de las pruebas de HACH® donde la muestra se calienta dos horas con dicromato de potasio (0.004 M). 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 en un espectrofotómetro HACH® DR 500 a 620 nm. El reactivo de DQO también contiene iones de plata y de mercurio. La plata es un catalizador y el mercurio se utiliza para formar complejos de las interferencias de cloruro.

4.5.16 Demanda Biológica de Oxígeno

La demanda biológica de oxígeno (DBO) se calculó mediante el método de dilución 8043 de las pruebas de HACH®. La determinación de DBO se realizó incubando una muestra de vinazas en un período estándar de cinco días y determinando el cambio en el contenido de oxígeno disuelto mediante un respirómetro de 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 la muestra (ej. aguas naturales y residuales) y se determina por la diferencia entre el oxígeno disuelto inicial y el oxígeno disuelto después de cinco días de incubación a 20°C.

4.5.17 Producción de CO_2

La producción de CO_2 fue determinada durante un periodo de 70 días (Bartha y Pramer, 1965). Este análisis se realizó con 20 g de muestra el cual se agregó a un microcosmos (un frasco cerrado herméticamente donde se depositó un vial de NaOH, 5 mL de agua para evitar pérdida de humedad y la muestra de suelo) para evaluar la producción de CO_2 producido y capturado en NaOH 1 M. El CO_2 capturado en el NaOH se determinó por titulación con HCl 0.1 M (Jenkison y Powlson, 1976). El CO_2 fue calculado por la siguiente fórmula:

$$C - CO_2 = \left(\frac{mg}{kg\ suelo\ seco}\right) = \frac{(V_{HCl} - V_{Bl}) * M1 * 20 * 12 * 1000 * 100}{5 * Wm * (100 - \%H)}$$

Donde:

V_{HCl} = volumen de HCl empleado en titular la muestra (mL).

V_{Bl} = volumen de HCl empleado en titular el blanco (mL).

M1 = molaridad real del ácido clorhídrico preparado y estandarizado.

20 = volumen de NaOH total para capturar el CO_2 (mL).

12 = peso equivalente del C en el CO_2.

Wm = masa húmeda de la muestra de suelo para el análisis (g).

%H = Porcentaje de humedad de la muestra de suelo.

4.5.18 Análisis estadístico

Los datos de nitrificación y de la generación de gases de efecto invernadero fueron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA) de dos o tres vías usando un PROC GLM (un procedimiento para modelos lineales generalizados) con el programa estadístico SAS (2009) para analizar las diferencias significativas entre los tratamientos en el proceso de nitrificación y desnitrificación con la prueba de Tukey y con un valor de $P < 0.05$, (un nivel de confianza del 95%). Además del módulo del software SAS PROC MIXED fue utilizado para evaluar las variables evaluadas: suelo, CRA, tiempo, y tipo de irrigación, así como sus interacciones sobre la mineralización de C (medido como CO_2), nitrógeno (NO_3^-, NO_2^- y NH_4^+) y gases de efecto invernadero (CO_2, N_2O, CH_4).

Capítulo 5

Resultados y Discusión

"Viento"
Martha Sotomayor

5 Resultados y discusión

5.1 Caracterización del suelo y las vinazas tequileras

5.1.1 Caracterización del suelo

La composición fisicoquímica del suelo se muestra en la Tabla 3. Los dos suelos muestreados fueron de tipo Feozem (INEGI, 2014; WRB, 2015), el cual presentó una elevada cantidad de materia orgánica. Este tipo de suelo es reportado por encontrarse en suelos forestales y de agricultura. Son suelos que requieren situaciones específicas de clima favorable (humedad) y de vegetación abundante.

Comparando el suelo evaluado con la norma mexicana de fertilidad NOM-021-SEMARNAT-2006 y la USDA 2014, se observó que ambos suelos tuvieron un pH neutro. Para la norma mexicana los suelos fueron muy fuertemente salinos debido a su CE y alta CIC. El contenido de fósforo disponible medido como PO_4^{-3} (en SC 0.1 mg kg^{-1} y en SV 0.1 mg kg^{-1}) y FT (en SC 1.7 mg kg^{-1} y en SV 3.1 mg kg^{-1}) fue clasificado como bajo y muy bajo de acuerdo a la USDA 2014. El contenido de MO (en SC de 93.7 g kg^{-1}y en SV de 74.4 g kg^{-1}) fue clasificado como medio de acuerdo a la NOM. Además presentó un contenido muy bajo en NH_4^+, NO_2^- y NO_3^-, pero un alto contenido de NT. Esto indicó que el nitrógeno estaba en forma orgánica. En metales como Pb, Cd y Ni se clasificó como normal y el contenido de Fe, Mn, Zi y Cu fue apropiado de acuerdo a la norma mexicana (NOM-021-RECNAT, 2000).

La clasificación textural para ambos suelos fue franco arenoso. Este tipo de suelos son capaces de drenar rápidamente el exceso de agua, pero no pueden mantener cantidades importantes de agua o nutrientes para las plantas. Las plantas cultivadas en este tipo de suelo requieren un riego más frecuente y una fertilización de suelos por una mayor concentración de arcilla y sedimentos (Schjonning et al., 1994). Al comparar el suelo control con el suelo vinaza se observó que se tuvieron diferencias significativas en los parámetros de pH, CRA y humedad siendo mayor el del suelo vinaza que el control ($P < 0.05$). Con respecto a las concentraciones de fósforo y nitrógeno total, el suelo vinaza fue mayor que el suelo control sin embargo, esto no fue diferente significativo.

Tabla 3. Caracterización del suelo vinaza y control y comparación con la normativa mexicana y americana.

Parámetro	Suelo Control	Suelo vinaza	NOM-021-SEMARNAT-2000	USDA 2014
Clasificación textural	Franco Arenoso	Franco Arenoso	N.E.	N.E.
Tipo de suelo	Feozem	Feozem	N.E.	N.E.
pH	6.5 ± 0.2^{A}	7.0 ± 0.3^{B}	Neutro	Neutro
Conductividad eléctrica (CE) (mS cm^{-1})	83.8 ± 31.2^{A}	80.4 ± 35.4^{A}	F. S	M. S.
Capacidad de retención de agua (CRA) (%)	10 ± 4.2^{A}	17.9 ± 5.3^{B}	N.E.	N.E.
Humedad (%)	9.4 ± 1.3^{A}	12.4 ± 2.0^{B}	N.E.	N.E.
Capacidad de intercambio catiónico (CIC) (Cmol kg^{-1})	27.3 ± 5.9^{A}	25.5 ± 6.8^{A}	Alto	N.E.
Ceniza (%)	92.6 ± 1.4^{A}	92.3 ± 3.1^{A}	N.E.	N.E.
Arena (%)	70.0 ± 3.0^{A}	68.7 ± 1.8^{A}	N.E.	N.E.
Arcilla (%)	16.9 ± 4.1^{A}	16.7 ± 1.5^{A}	N.E.	N.E.
Limo (%)	13.1 ± 3.3^{A}	14.7 ± 2.4^{A}	N.E.	N.E.
Fósforo disponible (PO_4^{-3}) (mg kg^{-1})	0.1 ± 0.03^{A}	0.1 ± 0.02^{B}	Bajo	Muy bajo
Fósforo total (PT) (mg kg^{-1})	1.7 ± 0.08^{A}	3.1 ± 1.7^{A}	Bajo	Muy bajo
Carbono orgánico total (COT) (g C kg^{-1})	54.3 ± 1.3^{A}	43.2 ± 1.9^{A}	N.E.	N.E.
Materia orgánica (MO) (g kg^{-1})	93.7 ± 1.5^{A}	74.4 ± 14.1^{A}	Alto	N.E.
Nitritos (NO_2^-) (mg kg^{-1})	0.01 ± 0.0^{A}	0.03 ± 0.01^{B}	Muy bajo	N.E.
Nitratos (NO_3^-) (mg kg^{-1})	0.45 ± 0.07^{A}	0.7 ± 0.3^{B}	Muy bajo	N.E.
Amonio (NH_4^+) (mg kg^{-1})	0.04 ± 0.03^{A}	0.05 ± 0.04^{A}	Muy bajo	N.E.
Nitrógeno total (NT) (mg kg^{-1})	971 ± 147^{A}	1259 ± 284^{A}	Alto	N.E.
Plomo (Pb) (mg kg^{-1})	12.0 ± 0.2^{A}	12.1 ± 3.2^{B}	Normal	N.E.
Cadmio (Cd) (mg kg^{-1})	$<0.2 \pm 0^{A}$	$<0.2 \pm 0^{A}$	Normal	N.E.
Níquel (Ni) (mg kg^{-1})	3.2 ± 0.5^{A}	2.9 ± 0.2^{A}	Normal	N.E.
Hierro (Fe) (g kg^{-1})	18.4 ± 5.3^{A}	14.4 ± 7^{A}	Apropiado	N.E.
Manganeso (Mn) (mg kg^{-1})	369 ± 115^{A}	309 ± 2.7^{A}	Apropiado	N.E.
Zinc (Zn) (mg kg^{-1})	34.8 ± 2.6^{A}	34.0 ± 5.3^{A}	Apropiado	N.E.
Cobre (Cu) (mg kg^{-1})	10.1 ± 10.6^{A}	10.6 ± 2.5^{A}	Apropiado	N.E.

Letras diferentes indican diferencia significativa entre ambos suelos ($P < 0.05$) ($n = 3$). N.E. Significa no especificado. F.S. significa fuertemente salino: M.S. significa moderadamente salino.

5.1.2 Caracterización de vinazas

La caracterización de las vinazas tequileras se presenta en la Tabla 4. Estas vinazas mostraron elevada cantidad de la demanda química de oxígeno (DQO) (57,762 mg L^{-1}) y demanda biológica de oxígeno (DBO) (25,367 mg L^{-1}). Al comparar las características de las vinazas tequileras con las reportadas por otros autores para vinazas tequileras (Tabla 4), se observó que tuvieron concentraciones similares de DBO (35 -60 g L^{-1}) y DQO (60 -100 g L^{-1}) y pH ácido de 3 a 4. También, se observó que el contenido de nitrógeno total (4.2 g L^{-1}) en las vinazas de este trabajo fue mayor al reportado (20-50 mg L^{-1}) para otras vinazas tequileras (López-López et al., 2010). Cuando se compararon las vinazas tequileras de este trabajo con otro tipo de vinazas tales como las de azúcar de caña, remolacha y mezcal, se observó que tienen similares concentraciones de pH, COT, NT, DQO y DBO con respecto a ese otro tipo de vinazas (Tabla 4).

Al comparar las concentraciones obtenidas en las vinazas de DQO 57.8 g L^{-1}, DBO 25.4 g L^{-1} y de NT 4.2 g L^{-1} con los límites permisibles de la NOM-001-SEMARNAT-1996 y la USEPA 2004 para uso de aguas residuales en riego agrícola, se encontró que estas normas no especifican límites permisibles para estos y para la mayoría de los parámetros analizados. Mientras que en el contenido de metales pesados si tienen límites permisibles, en los cuales el contenido de metales pesados de las vinazas utilizadas en este trabajo, se encuentran por debajo de los límites establecidos por dichas normas (Tabla 4).

A pesar de la amplia gama de tecnologías disponibles para el tratamiento de vinazas, la falta de reglamentación de las autoridades ambientales hace que la aplicación de vinazas al suelo o el agua, como ríos o arroyos sin tratamiento alguno sea la forma más común de descargarlos (Moraes et al., 2014). Actualmente la legislación brasileña permite el riego con vinazas en campos agrícolas, la única restricción es la cantidad de óxido de potasio (K_2O) a una concentración de < 185 kg por año (CETESB, 2006). Sin embargo, esta norma, al igual que la mexicana y la de la USEPA (2004) no establecen límites para otros parámetros como el caso de DBO, DQO, sólidos totales y fenoles por mencionar algunos.

Tabla 4. Caracterización de la vinaza tequilera utilizada en este trabajo y comparación con otro tipo de vinazas y con la norma mexicana y americana.

Parámetro	Vinaza	Azúcar de caña	Remolacha	Mezcal	Tequila	*NOM-001-SEMARNAT-1996	*USEPA 2004
pH	3.5 ± 0.1	3.8 - 4.7 [a]	4.3 – 5.35 [b]	3.6 – 3.8 [a]	3.4 – 4.5 [b l]	N.E	6
Conductividad eléctrica (CE) (mS cm^{-1})	3.3 ± 0.1	16 [c]	35- 40 [d g]	2.6 – 4.2 [a]	0.00195 [f]	N.E	N.E
Fósforo disponible (PO_4^{-3}) (mg L^{-1})	22.4 ± 1	20 – 233 [a]	120 [g]	290 - 1705 [a]	100- 700 [l]	N.E	N.E
Fósforo total (PT) (mg L^{-1})	26.4 ± 1	1 - 190 [b]	160 - 163 [b]	N.E.	41 [b]	N.E	N.E
Carbón orgánico total (COT) (g L^{-1})	16.8 ± 1	26 – 32 [a]	196 - 592 [d h]	N.E.	16.8 [&]	N.E	N.E
Materia orgánica (MO) (%)	4.6 ± 0.6	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E	N.E
Nitritos (NO_2^-) (mg L^{-1})	2.2 ± 0.2	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E	N.E
Nitratos (NO_3^-) (mg L^{-1})	580 ± 88	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E	N.E
Amonio (NH_4^+) (mg L^{-1})	1.4 ± 1.0	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E	N.E
Nitrógeno total (NT) (mg L^{-1})	4200 ± 0.1	975 [a]	1800 - 4750 [b]	660 [a]	20 - 50 [l]	N.E	N.E
DQO total (DQO) (g L^{-1})	57.8 ± 1.9	59 – 80.5 [a]	55.5 – 91.1 [b]	56.2 - 123 [a]	60 – 100 [l]	N.E	N.E
DQO soluble (DQO) (g L^{-1})	53.7 ± 3.6	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E	N.E
DBO total (DBO) (g L^{-1})	25.4 ± 1.7	31.5 – 75 [a]	27.5 – 44.9 [b]	N.E.	35-60 [l]	N.E	45.0
DBO soluble (DBO) (g L^{-1})	12.7 ± 1.6	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E	N.E
Sólidos totales (mg L^{-1})	40.8 ± 3.0	63 – 69 [a]	109 [g]	26 - 95 [a]	25 - 50 [j]	N.E	N.E
Sólidos suspendidos totales (mg L^{-1})	11.2 ± 2.0	3 – 11 [a]	3.6 [g]	3.1 – 8.4 [a]	2 - 8 [l]	N.E	45.0
Sólidos suspendidos volátiles (mg L^{-1})	12.5 ± 3.0	2.5 – 9 [a]	2.5 [g]	1.1 – 6.8 [a]	1.9 – 7.5 [l]	N.E	N.E
Sólidos volátiles totales (mg L^{-1})	37.3 ± 3.0	82	N.E.	N.E.	N.E.	N.E	N.E
Sólidos disueltos totales (mg L^{-1})	29.6 ± 3.0	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E	N.E
Sólidos sedimentables (mL L^{-1})	120 ± 5.0	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E	N.E
Fenoles (mg L^{-1})	332.8 ± 35.8	34 [b]	450 [b]	478 - 542 [a]	44 - 81 [b]	N.E	N.E
Arsénico (As) (mg L^{-1})	< 1.0 ± 0.0	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	0.4	N.E
Cadmio (Cd) (mg L^{-1})	< 0.2 ± 0.0	0.04 – 1.36 [b]	< 0.1 [h]	N.E.	0.01 – 0.2 [b]	0.1	0.01-0.05
Cobre(Cu) (mg L^{-1})	< 1.0 ± 0.0	N.E.	2.1 - 5 [b]	N.E.	0.36 - 4 [b]	6	0.2-5
Cromo (Cr) (mg L^{-1})	< 1.0 ± 0.0	N.E.	< 0.01 [h]	N.E.	N.E.	1	0.1-1
Mercurio (Hg) (mg L^{-1})	< 1.0 ± 0.0	N.E.	<0.001 [i]	N.E.	N.E.	0.01	0.002
Plomo (Pb) (mg L^{-1})	< 1.0 ± 0.0	0.02 – 0.48 [b]	< 5 [b]	N.E.	0.065 – 0.5 [b]	10	5-10
Níquel (Ni) (mg L^{-1})	< 1.0 ± 0.0	N.E.	<0.1 [h]	N.E.	<0.02 [l]	4	0.2-2
Zinc (Zn) (mg L^{-1})	2.3 ± 0.0	15 [a]	11 [h]	N.E.	<1 [l]	20	5-20
Hierro (Fe) (mg L^{-1})	24.0 ± 0.9	12.8 - 203 [b a]	203 - 226 [b]	N.E.	35.2 - 45 [b]	N.E	N.E

*Límites permitidos para descargas en suelo; [a] Robles-González et al., (2012); [b] España-Gamboa et al.,(2011); [c] Bautista-Zúñiga et al., (1998); [d] Núñez-Zofío et al. (2013) ; [e] Conde-Bueno et *al.*, (2009); [f] Iñiguez et al. (2005); [g] Jiménez et al., (2003); [h] Tejeda et al., (2009); [i] Tejeda et al., (2007); [j] Santos et al., (2014); [k] Vlyssides et al.,; (2010), [l] López-López et al. (2010); [&] Información personal; N.E. Significa no especificado

5.2 Mineralización de Carbono

El tratamiento SV-V en CRA de 40, 80 y 100% presentó la mayor mineralización de C en 70 días (7,151, 4,175 y 5,694 mg kg^{-1} respectivamente). Para el suelo control con vinaza (SC-V) también se presentó una elevada mineralización en las diferentes CRAs (Figura 6). Esto indicó que el proceso de mineralización del C se incrementó por la adición de vinazas tequileras independientemente del tipo de suelo, lo cual es indicio de la degradación de la materia orgánica de las vinazas en el suelo.

En CRA de 40% no se observaron diferencias significativas entre los dos suelos (SC o SV) irrigados con Agua (A) o Vinaza (V), su tasa de producción de CO_2 fue muy similar hasta el día 28. Después de este día ambos suelos presentaron un incremento en el día 56, donde se observó la mayor producción de CO_2 ya que después hay una disminución hasta el día 70. En las CRAs de 80 y 100% los tratamientos SC-V y SV-V (irrigados con vinaza) mostraron la mayor producción de CO_2 con respecto a los tratamientos SC-A y SV-A (irrigados con agua), con diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 6).

Al comparar los tratamientos SC-V-80 y SV-V-80 se observó que presentaron 3 y 6.8 veces más producción de CO_2 que los tratamientos regados con agua (SC-A-80 y SV-A-80) respectivamente, mientras los tratamientos SC-V-100 y SV-V-100 tuvieron 2.6 y 11.5 veces más producción de CO_2 que los tratamientos con agua (SC-A-100 y SV-A-100) (Figura 6 b y d). La alta producción de CO_2 pueden atribuirse a la rápida descomposición de polisacáridos extraíbles del material adicionado como el presente en las vinazas (Trinsoutrot et al., 2000), ya que las vinazas tequileras contienen desde 5,000 a 20,000 mg L^{-1} de azúcares reductores totales (López-López et al., 2010). En estudios similares Zhu *et al.* (2013) reportaron una alta mineralización de carbono en un suelo de cultivo con veza de la leche china (*astragalus sinicus*) en diferentes CRAs de 50, 75 y 90% y con una cantidad inicial de carbono de 1.19 g C kg^{-1}. Estos autores obtuvieron valores de carbono mineralizado de 1,372, 1,684 y 1,720 mg C kg^{-1} respectivamente. En este trabajo se observó una mineralización de C de 576, 2,594 y 5,694 mg C kg^{-1} en CRAs de 40, 80 y 100% respectivamente al adicionar las vinazas al suelo control en 70 días.

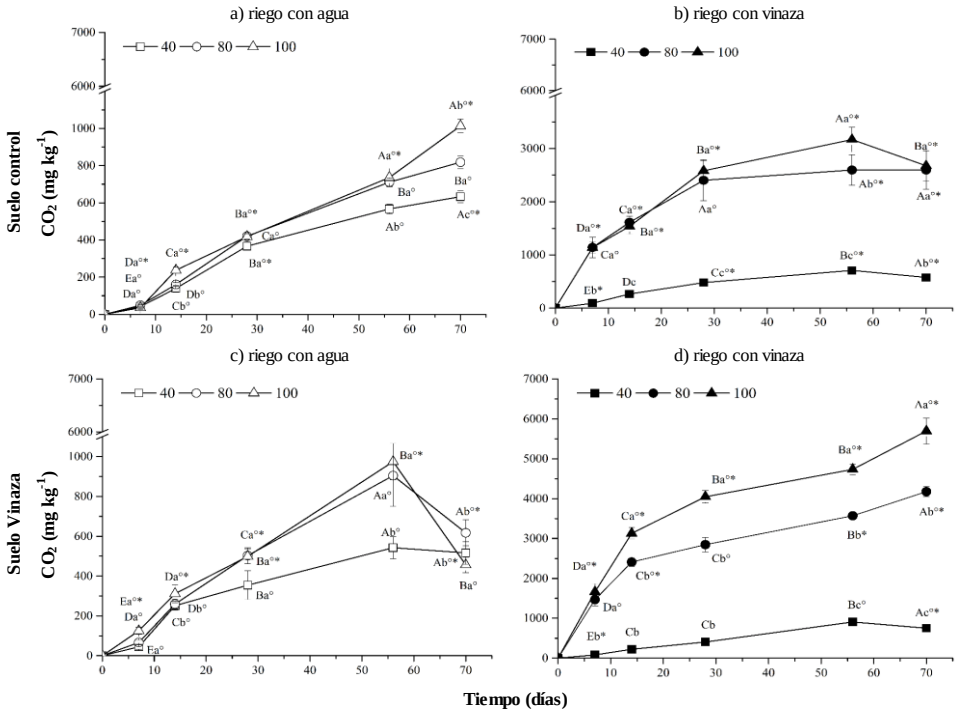


Figura 6. Producción de CO_2 durante la mineralización del carbono en suelo control y vinaza. Letras minúsculas diferentes significan diferencias significativas entre CRA al mismo tiempo, mientras que letras mayúsculas diferentes significan diferencias significativas entre el tiempo en la misma CRA. * Significa diferencias significativas entre el suelo control (SC) y suelo vinaza (SV). ° significa diferencias significativas diferente riego agua (A) o vinaza (V).

5.3 Mineralización de Nitrógeno

En el contenido de amonio todos los tratamientos tuvo un comportamiento similar en la CRA de 40%, observando un incremento hasta el día 28 y después una disminución de la concentración hasta el día 70 (Figura 7). En las CRA de 80 y 100% la mayor concentración de amonio se observó en el tratamiento SC-V (7.5 y 8.4 mg kg^{-1} respectivamente), mientras que en el tratamiento SC-V-100 al día 28 fue de 2.68 mg kg^{-1}. En la CRA de 80% se observó que el tratamiento SC-V tuvo un aumento constante durante los 70 días, mientras que en los tratamientos SV-V-80 y SC-A-80 tuvieron una disminución en el contenido de amonio en el día 28 (Figura 7). De manera similar el contenido de nitritos presentó un incremento hasta el día 28 en todas las CRAs y en ambos suelos, posteriormente tuvo una disminución hasta el día 70 (Figura 7).

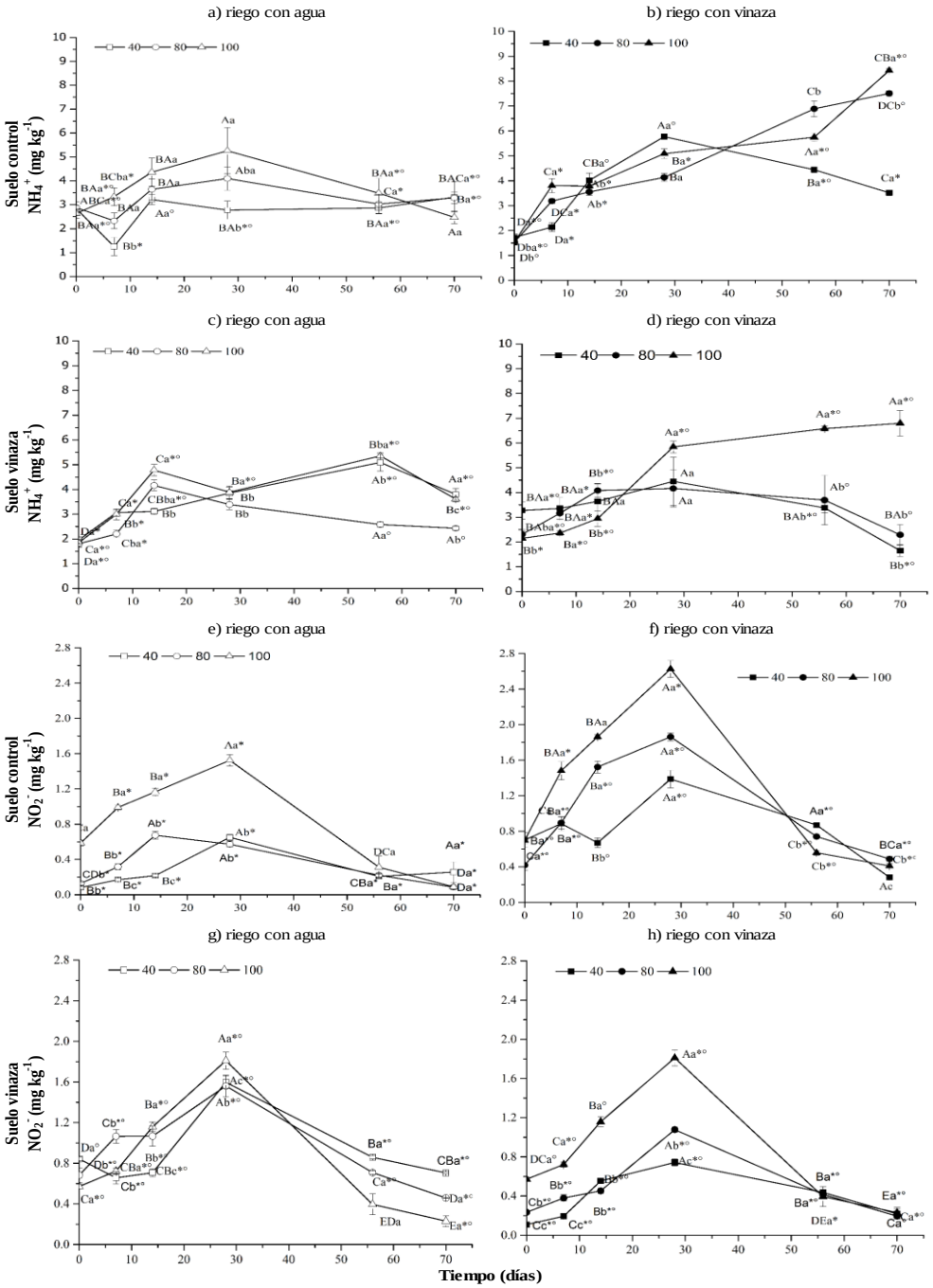


Figura 7. NH_4^+ y NO_2^-en suelo control y vinaza con $P < 0.05$ en $n = 9$. Letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas entre CRA al mismo tiempo, mientras que letras mayúsculas diferentes significan diferencias significativas entre el tiempo en la misma CRA. * Denota diferencias significativas entre el suelo control (SC) y suelo vinaza (SV). ° significa diferencias significativas diferente riego agua (A) o vinaza (V).

La mineralización del nitrógeno es completa cuando el nitrógeno orgánico se mineraliza hasta nitratos (NO_3^-), de tal manera que la mineralización de N está dada principalmente por las concentraciones de nitratos. Los tratamientos SC-V y SV-A presentaron un aumento constante en la concentración de nitratos durante los 70 días en CRAs de 40 y 80%, mientras que en la CRA del 100% el tratamiento SV-A tuvo una disminución en el día 56. En CRAs del 80 y 100% la mayor concentración de nitratos se observó en el tratamiento SC-V (34.6 y 45 mg kg^{-1} respectivamente). Sin embargo, en el tratamiento con riego de vinazas (SV-V) se presentó un aumento durante los primeros 28 días y posteriormente se observó una disminución sin diferencia significativa con respecto a los tratamientos (Figura 8).

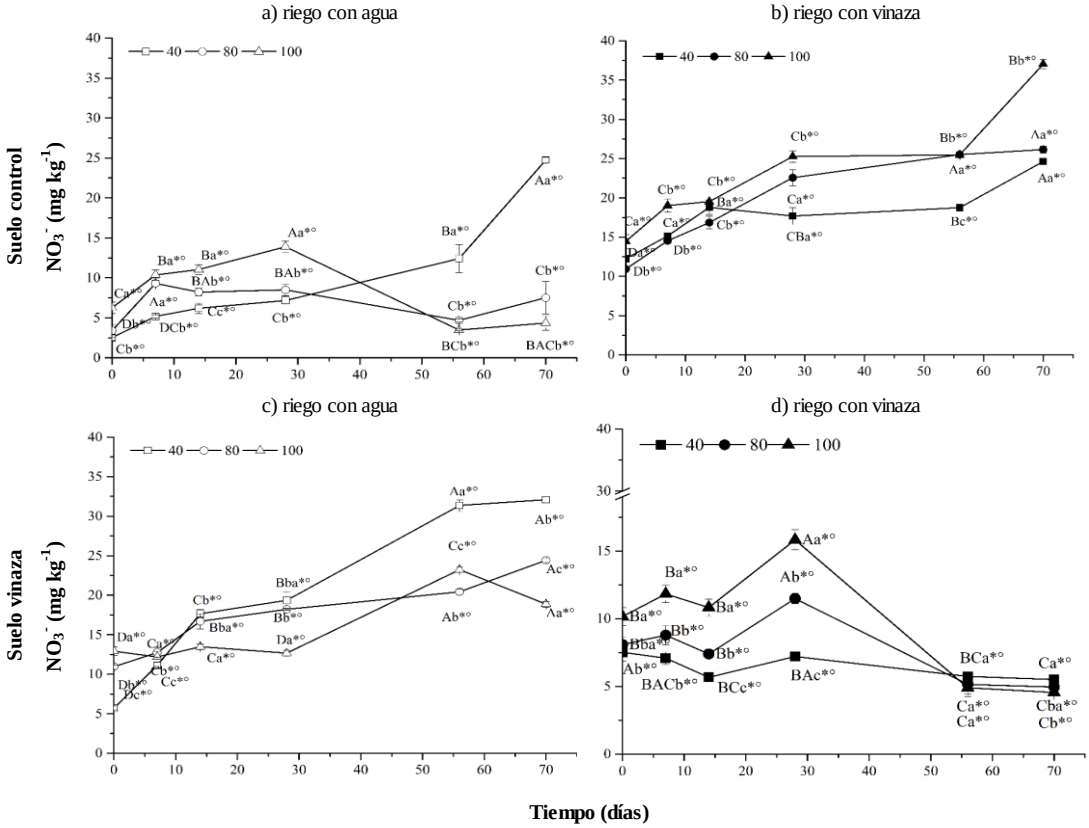


Figura 8. Nitratos en suelo control y vinaza con $P < 0.05$ en $n = 9$. Letras minúsculas diferentes significan diferencias significativas entre CRA al mismo tiempo, mientras que letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas entre el tiempo en la misma CRA. * Denotan diferencias significativas entre el suelo control (SC) y suelo vinaza (SV). ° Denota diferencias significativas diferente riego agua (A) o vinaza (V).

Este comportamiento ha sido reportado con otros residuos de plantas cuando se agregan al suelo. Por ejemplo, Ruiz-Valdiviezo et al. (2010), reportaron una disminución de amonio y nitratos en diferentes suelos con la adición de residuos de *Jatropha curcas* en 56 días en un ambiente aerobio a CRA de 40%. También Zhu et al. (2013) encontraron una disminución en el contenido de nitritos y nitratos en suelos de cultivo de veza de la leche china (*astragalus sinicus*), en CRA de 50, 75 y 90%.

Por otro lado al considerar la mineralización total del nitrógeno (suma de NH_4^+, NO_2^-, NO_3^-), el tratamiento SV-A-40 tuvo un incremento significativo en la mineralización después del día 28, y el mismo tratamiento pero regado con vinaza (SV-V-40) tuvo una disminución después del día 28 ($P > 0.05$). El tratamiento SV-A-40 fue 5 veces mayor en la mineralización de nitrógeno que el tratamiento SV-V-40 (Figura 9). La cantidad de nitrógeno mineralizado en SC-V en CRA de 80 y 100%, fue 4 y 5.5 veces mayor que los tratamientos regados con agua respectivamente (Figura 9).

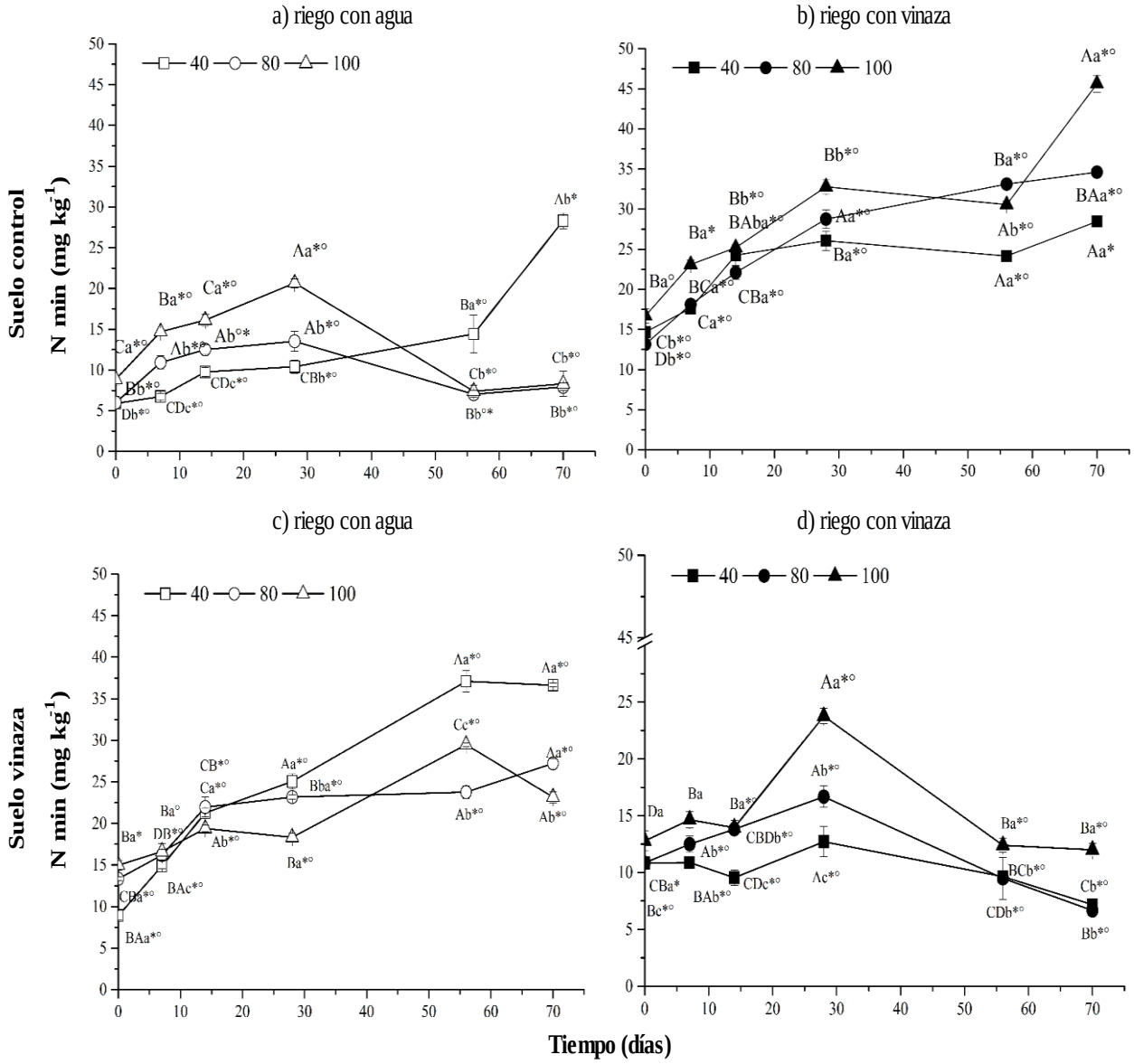


Figura 9. Mineralización de N en suelo control y vinaza con P < 0.05 en n = 9. Letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas entre CRA al mismo tiempo, mientras que letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas entre el tiempo en la misma CRA. * Denotan diferencias significativas entre el suelo control (SC) y suelo vinaza (SV). ° Denota diferencias significativas diferente riego agua (A) o vinaza (V).

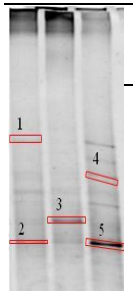
En los tratamientos SV-A en CRA de 80 y 100%, la mineralización de N fue 4 y 2 veces mayor que con el riego de vinazas respectivamente (Figura 9). La mineralización mostrada en estas CRAs de 80 y 100% puede ser posible a que el proceso de nitrificación también ocurre en ambientes anaerobios, esto debido a micro sitios presentes en el suelo que podrían contener O_2 disponible para llevar a cabo la oxidación de la materia orgánica, lo cual se ha reportado por otros autores (Khalil et al., 2004). Esto se corroboró con el análisis molecular, el cual indicó que en el suelo control y suelo vinaza se tuvo la presencia de arqueas como son los géneros *Crenarchaeote* sp., *Nitrososphaera* sp., *Thaumarchaeote* sp. y *Nitrosotalea* sp. (Tabla 5). Estos grupos de arqueas se han reportado en procesos de nitrificación bajo condiciones anaerobias (Nicol y Schleper, 2006; Schmidt et al., 2015; Spang et al., 2012; Volant et al., 2012), lo cual podría explicar la mineralización de N hasta nitratos en los tratamientos con CRAs de 80 y 100% en suelo control regado con vinazas en este trabajo.

En este trabajo se adicionó una dosis de vinaza tequilera equivalente en un intervalo de 22 a 47 mg N kg^{-1} suelo (SC y SV) para las diferentes CRAs (40, 80 y 100%), y considerando que estos suelos contenían 971 y 1,259 mg N kg^{-1} suelo, sólo se mineralizó de 7 a 37 mg N kg^{-1} suelo (< 4%) a los 70 días. Estos resultados indicaron que la mineralización del N no se realizó por completo, por lo que esto sugiere que se presentó una inmovilización del nitrógeno. En los procesos de inmovilización el nitrógeno inorgánico es transformado a nitrógeno orgánico, el cual es sintetizado por microorganismos que lo utilizan para la formación de células y tejidos, así como proteínas, enzimas, etc. (Thompson, 1952).

La inmovilización del nitrógeno depende de varios factores incluyendo la relación C/N (Frankenberger y Abdelmagid, 1985). Suelos con un alta relación C/N (de 30 a 136) tienen una rápida inmovilización de N, mientras que en suelos con baja relación C/N (de 9 a 23) presentan baja inmovilización del N (Baoqing et al., 2014). En este trabajo la relación C/N en el tratamiento SC-V fue de 34, 24y 17en las CRAs de 40, 80 y 100% respectivamente. En el tratamiento SV-V la relación C/N fue de 48, 36 y 27 en CRAs de 40, 80 y100% respectivamente. De tal manera que todos los tratamientos tuvieron alta relación C/N y con el riego de vinazas se promueve esta relación y así la inmovilización de N.

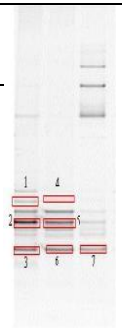
Tabla 5. Identificación por DGGE de bacterias y arqueas presentes en los suelos control y vinaza.

Suelo control



Bacterias

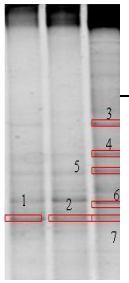
Banda	Microorganismos	Identidad (%)	Número de acceso
2,5	*Clostridium beijerinckii*	100	KJ169574.1
1	*Massilia aurea*	98	KJ734883.1
3	*Sphingomonas ginsengisoli*	99	NR_132664.1
4	*Clostridium* sp.	95	DQ831125.1



Arqueas

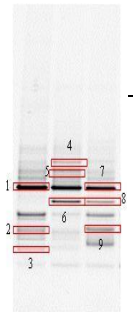
Banda	Microorganismos	Identidad (%)	Número de acceso
2,5	*Crenarchaeote* sp.	99	CU917467.1
1	*Nitrosotalea* sp.	98	KJ540205.1
3,6, 7	*Nitrososphaera* sp.	98	KP027212.1
4	*Euryarchaeote* sp.	95	KJ566484.1

Suelo vinaza



Bacterias

Banda	Microorganismos	Identidad (%)	Número de acceso
1,2	*Clostridium beijerinckii*	100	KJ169574.1
3	*Massilia aurea*	98	KJ734883.1
4,5	*Massilia* sp.	93	EF075289.1
7	*Methylobacterium* sp	91	LC036252.1
6	*Bacillus* sp.	99	KM057801.1



Arqueas

Banda	Microorganismos	Identidad (%)	Número de acceso
2,4, 5,9	*Crenarchaeote* sp.	99	CU917467.1
3	*Nitrosotela* sp.	99	KJ540205.1
6,8	*Methanosarcina* sp.	99	CP009517.1
1,7	*Thaumarchaeote* sp	100	KF276418.1

El nitrógeno es inmovilizado ya sea por procesos bióticos o abióticos. La mayoría de la inmovilización de la materia orgánica del suelo es en procesos bióticos. Otros trabajos han estimado que los microorganismos del suelo son responsables de un 10 a 50% de la inmovilización de NH_4^+ (Brookes et al., 1985). Otros estudios analizados por NMR (Resonancia magnética nuclear, por su siglas en inglés) con adición de isotopos radioactivos de $^{15}NH_4^+$ o $^{15}NO_3^-$ al suelo, encontraron que el isotopo ^{15}N se presentó en forma orgánica como péptidos o proteínas (en un 80%), y ácidos nucleicos después de algunos meses de incubación *in situ*, lo cual indicó que la conversión del nitrógeno fue por la ruta de síntesis de proteínas por los microorganismos. (Clinton et al., 1995).

De tal manera que en este experimento se logró observar que aun cuando el suelo contiene nitrógeno y se adicione más nitrógeno en el suelo, éste N no queda disponible para las plantas en forma de NH_4^+ o NO_3^-, debido a una inmovilización. Y en un período de 70 días éste nitrógeno no fue disponible. La CRA de 40% es la condición aerobia donde la nitrificación ocurre predominantemente, sin embargo también en esta CRA se presentó la inmovilización de N. Además en un ambiente anaerobio, se observó que ocurre una mineralización pero hasta los 28 días, después también se presenta el fenómeno de inmovilización.

5.4 Producción de Gases de efecto invernadero (GEI)

5.4.1 Emisiones de dióxido de carbono (CO_2)

En esta parte del trabajo, el proceso de desnitrificación fue evaluado en un período de tiempo corto (7 días), sin embargo también se cuantificó la emisión de CO_2 en las mismas CRAs (40, 80 y 100%), para los mismos tratamientos que en la experimentación anterior. Y para inducir la ruta de desnitrificación se tuvieron los tratamientos con la adición de acetileno, tal como se indicó en la sección de metodología de este documento. Los resultados obtenidos indicaron que la producción más alta de CO_2 se observó en CRA de 80 y 100% en un suelo control regado con vinazas (SC-V) y con acetileno, presentando un incremento significativo después de 3 días. Sin embargo, al comparar los tratamientos SC-V-80 y SC-V-100 entre sí, éstos no presentaron diferencias significativas al día 7. Pero sí fueron significativamente mayores que el tratamiento SC-V-40 (Figura 10).

Los tratamientos sin acetileno tuvieron el mismo comportamiento pero con una menor emisión de CO_2 con respecto a los tratamientos con acetileno, donde las emisiones de CO_2 fueron 8.3 y 10 veces menor en el suelo control regados con agua CRAs de 80 y 100% respectivamente. (Figura 10). Las emisiones de CO_2 en los tratamientos SC-V-80 y SC-V-100% con acetileno fueron 15 y 13 veces mayor que los tratamientos sin acetileno (Figura 10).

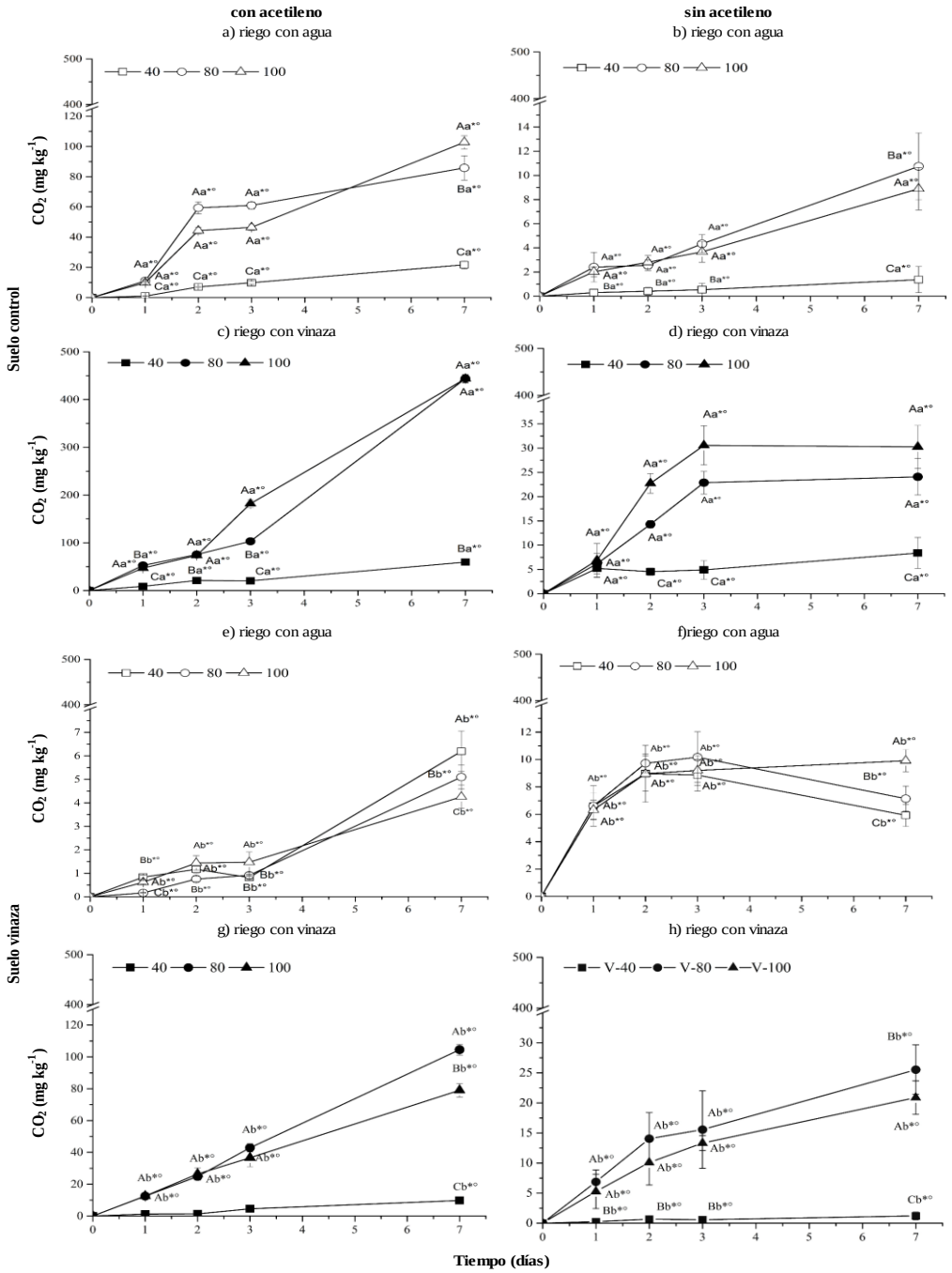


Figura 10. Emisiones de CO_2 en suelo control y vinaza con $P < 0.05$ en $n = 9$. Letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas entre la CRA en el mismo tiempo, mientras que letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas entre el tiempo en la misma CRA. * denotan diferencias significativas entre el riego con agua (A) y vinaza (V). ° significa diferencias significativas entre tratamientos, con o sin el acetileno.

Similarmente, los tratamientos con acetileno SV-V presentaron la mayor emisión de CO_2 con respecto a los tratamientos con acetileno regados con agua SV-A, lo cual fue significativo, siendo estos 1.6, 22 y 20 veces mayor en CRAs de 40, 80 y 100% respectivamente. Como ya se mencionó, las emisiones de CO_2 en los tratamientos sin acetileno fueron menores con respecto a los tratamientos con acetileno (Figura 10), esta diferencia puede ser explicada por el hecho que el acetileno puede ser oxidado bajo condiciones aerobias y anaerobias produciendo CO_2 por su degradación (Kanner y Bartha, 1979).

La oxidación de acetileno es realizada por bacterias aerobias como *Mycobacterium lacticola, Nocardia rhodochrous, Rhodococcus, Rhodococcus rhodochrous* y *Bacillus* sp. (Rosner et al., 1997). En este trabajo, el análisis por DGGE indicó que en el suelo vinaza contenía bacterias del género *Bacillus sp.*(Tabla 5), el cual puede utilizar al acetileno como fuente de carbono y energía para su crecimiento generando CO_2 (Rosner et al., 1997).

Además, bacterias como *Sphingomonas sp., Methylobacterium sp.* y *Clostridium beijerinckii,* fueron encontradas en los dos suelos. Estas bacterias son capaces de degradar compuestos aromáticos, hidrocarburos policíclicos aromáticos, naftaleno, fenantreno, tolueno y azúcares como hexosas y pentosas y fenoles produciendo CO_2 (Andreoni et al., 2004; Baraniecki et al., 2002; Bellido et al., 2015; Maddela et al., 2015). Las vinazas (azúcar de caña, remolacha, mezcal) usualmente contienen alta cantidad de compuestos fenólicos (34-542 mg L^{-1}) (Tabla 4) (España-Gamboa et al., 2011; Robles-González et al., 2012), mientras que las vinazas de tequila tuvieron un contenido de 332.8 ± 35.8 mg L^{-1} de fenoles totales. Probablemente estos microorganismos utilizaron el azúcar y fenoles presentes en las vinazas cuando se agregaron al suelo incrementando las emisiones de CO_2 por efecto de su degradación.

Goncalves de Oliveira et al. (2013) reportaron que el riego con vinazas de azúcar de caña en un suelo agrícola triplicó las emisiones de CO_2 bajo condiciones de inundación (200 m^3 ha^{-1}). En este trabajo la adición de vinazas tequileras tanto en el suelo control como en el suelo vinaza incrementó las emisiones de CO_2 las cuales fueron de 2 a 20 veces mayor en CRAs de 80 y 100% que cuando se agregó agua. La dosis aplicada a estas CRAs fue tan sólo equivalente a 0.728 y

1.484 m^3 ha^{-1} respectivamente (Figura 10). Serrano-Silva et al. (2011) reportaron un incremento significativo en las emisiones de CO_2 (236 mg CO_2 -C kg^{-1} $día^{-1}$) cuando 84 mg C kg^{-1} presentes en la urea (CH_4N_2O) fueron adicionados a el suelo a una CRA de 50%. Rodriguez et al. (2011) reportaron que la adición de biosólidos de aguas residuales (2,400 mg C kg^{-1}) a el suelo generó emisiones de CO_2 de 773, 728, 832 y 757 mg CO_2 -C kg^{-1} $día^{-1}$ a CRAs de 40, 60, 80 y 100% respectivamente. En este trabajo se adiciono de 1,000-9,000 mg C kg^{-1} suelo con vinazas tequileras, las cuales generaron emisiones de 3 a 50 mg CO_2 -C kg^{-1} $día^{-1}$ en CRAs de 80 y 100% para los diferentes tratamientos.

5.4.2 Emisiones de óxido nitroso (N_2O)

Las emisiones de N_2O en el tratamiento SC-V con y sin acetileno tuvieron un incremento significativo a partir del primer día en CRAs de 80 y 100% (Figura 11). Contrariamente los tratamientos SC-A tuvieron una disminución después del día 1 en CRA de 80 y 100%, sin embargo, en CRA de 40% las emisiones de N_2O fueron significativamente menores que en CRAs de 80 y 100% en todos los días (Figura 11). El tratamiento SV-V con acetileno tuvo un incremento significativo en las emisiones de N_2O después del primer día a CRAs de 80 y 100% con concentraciones de 0.23 mg kg^{-1} en el primer día ($P< 0.05$). Los tratamientos SC-V incrementaron en el orden de 7.5 y 6 veces más que en los tratamientos SC-A con acetileno en CRAs de 80 y 100%. Para los tratamientos SC-V sin acetileno las emisiones de N_2O fueron 65 y 187 veces más que los tratamientos con agua SC-A a CRAs de 80 y 100% (Figura 11).

Los tratamientos SV-V con acetileno presentaron incrementos en las emisiones de N_2O de 460 y 767 veces más que en los tratamientos con agua SV-A en CRAs de 80 y 100%. Esto indicó que las emisiones de N_2O fueron debidas a la adición de vinazas y por la ruta de desnitrificación. Además, un incremento del contenido de agua en el suelo hace que la ruta de desnitrificación sea el proceso dominante para las emisiones de N_2O, esto debido a la presencia de sitios anaerobios que favorecen la reducción del nitrógeno (Zhu et al., 2013). El análisis molecular de las poblaciones microbianas indicó la presencia de bacterias del genero *Massilia* sp. en ambos suelos (SC y SV), y en particular en el suelo vinaza se encontró a *Massilia aurea* (Tabla 5). Se ha reportado que estas bacterias reducen nitratos y producen N_2O en condiciones aerobias (Gallego

et al., 2006). Además, en condiciones anaerobias algunos microorganismos pueden reducir nitratos y producir N_2O, como es el caso de algunas arqueas como *Euryarchaeote* sp. (Hu et al., 2013), las cuales se encontraron en el suelo control. En este suelo las emisiones de N_2O fueron mayores en los tratamientos con CRA de 40% para ambos tipos de riego. Lo cual sugirió que microorganismos como las arqueas el género *Euryarchaeote* sp. pudieron haber predominado.

Adicionalmente, un exceso de nitrógeno en el suelo podría promover las emisiones de N_2O como lo demostraron Dendooven et al. (1998). Estos autores encontraron que al adicionar 35 mL de desechos de cerdo con 300 mg NO^-_3 –N a el suelo se generó 28 g N_2O-N ha^{-1} $día^{-1}$. Similarmente, Rodríguez et al. (2011) reportaron que en diferentes CRAs (40, 60, 80 y 100%) y la adición de lodos de agua residual (243 mg N kg^{-1}) se generaron emisiones de N_2O de 1.047, 1.005, 2.199 and 2.201 mg N_2O-N kg^{-1} después de un día de su aplicación. Goncalves de Oliveira et al. (2013) reportaron que en una aplicación anual de 46 kg of N ha^{-1} con vinazas de azúcar de caña se presentó una emisión de N_2O de 0.31-0.52 kg $ha^{-1.}$ En este trabajo se adicionó un intervalo equivalente de 3.02 a 6.02 kg de N ha^{-1} en CRAs de 80 y 100% generando emisiones de 0.3 y 0.5 kg N_2O ha^{-1} a CRAs de 80 y 100% respectivamente, mientras que en tratamientos sin acetileno las emisiones fueron de 0.45 y 0.87 kg N_2O ha^{-1} (Figura 11). Estas emisiones son superiores a las reportadas por Goncalves de Oliveira et al. (2013) quien utilizó una dosis de vinazas de caña entre 7 y 15 veces mayor que la utilizada en este trabajo con vinazas de tequila. Esto sugiere que el potencial de emisión de las vinazas tequileras podría ser mucho mayor.

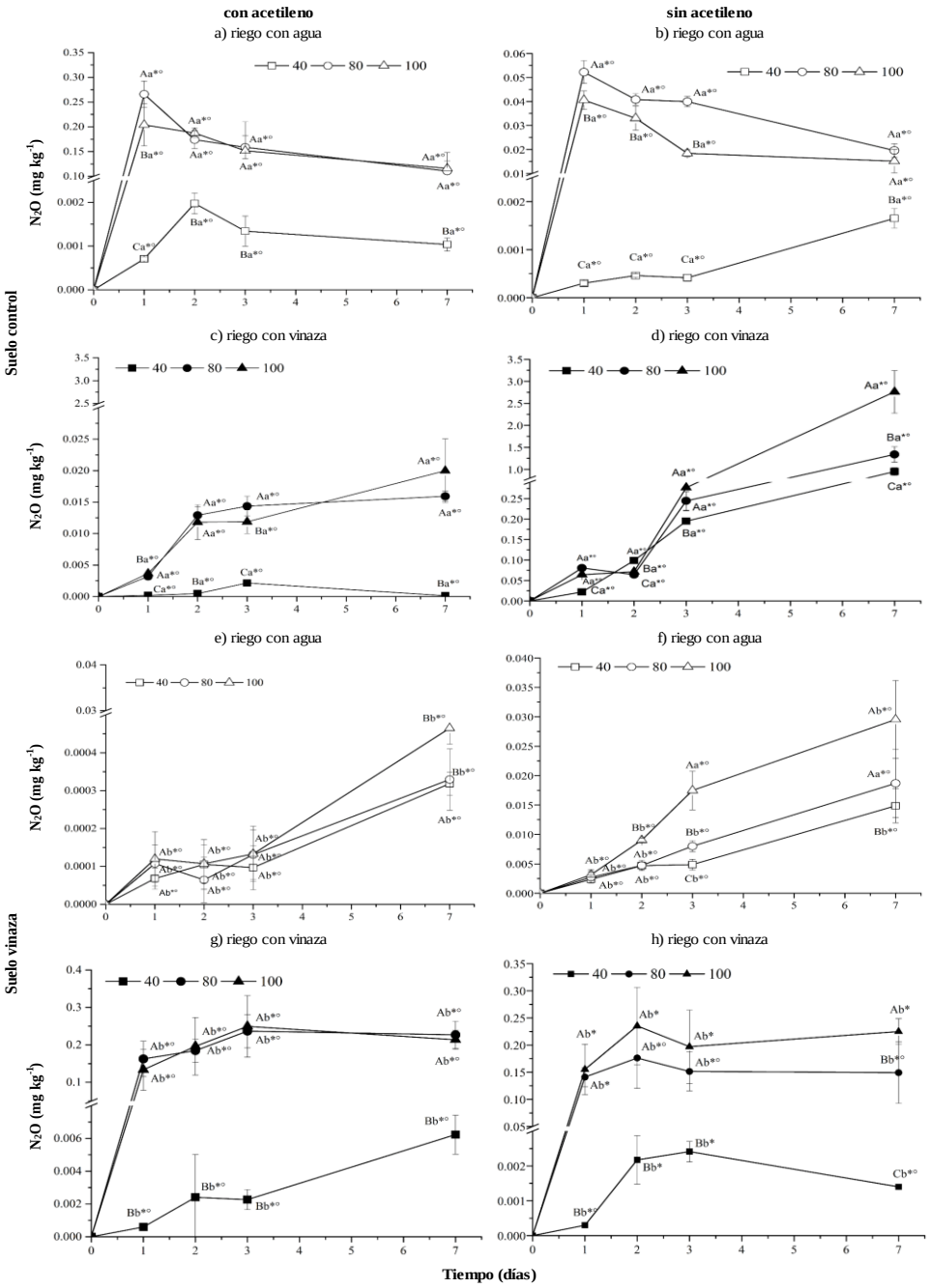


Figura 11. Emisiones de N_2O en suelo control y vinaza con $P < 0.05$ en $n = 9$. Letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas entre la CRA en el mismo tiempo, mientras que letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas entre el tiempo en la misma CRA. * denotan diferencias significativas entre el riego con agua (A) y vinaza (V). ° denotan diferencias significativas entre tratamientos, con o sin el acetileno.

5.4.3 Emisiones de metano (CH_4)

Por otro lado, se sabe que las emisiones de metano (CH_4) son favorecidas en condiciones anaerobias y con alta cantidad de materia orgánica en el suelo (Yao et al., 1999). El tratamiento SC-A con acetileno fue significativamente mayor que el tratamiento SC-V con un incremento de 1 a 1.3 veces mayor en todas las CRAs (Figura 13). Mientras que en los mismos tratamientos (SC-A) pero sin acetileno presentaron incrementos significativos de 5.3, 6.7 y 3.2 veces más que los tratamientos SC-V en CRAs de 40, 80 y 100% respectivamente (Figura 13). El suelo vinaza irrigado con agua (SV-A) y con acetileno tuvo emisiones similares de CH_4 durante los 7 días en las tres diferentes CRAs (40, 80 y 100%) con respecto a los tratamientos regados con vinaza (SV-V). Sin embargo, los tratamientos SV-V sin acetileno fueron 7, 9 y 8 veces mayores que los tratamientos SV-A a CRAs de 40, 80 y 100% respectivamente a los 7 días (Figura 13).

Los resultados sugieren que el C presente en las vinazas fue oxidado hasta generar CO_2 y una mínima cantidad se fue a la producción de CH_4. Este fenómeno es llamado baja afinidad de oxidación, el cual ocurre cuando el CH_4 es producido en un micrositio y después es difundido en micrositios aireados donde éste es convertido a CO_2 por microorganismos metanotróficos (Moreira y Siqueira, 2006). Los microorganismos metanotróficos son conocidos por la oxidación de CH_4 a CO_2 y son generalmente encontrados en suelos en condiciones de alta humedad (Nesbit y Breitenbeck, 1992). En este trabajo, el género *Euryarchaeote* sp., fue encontrado en el suelo control (Tabla 5). Esta arquea oxida CH_4 a CO_2 (Hu et al., 2013). La presencia de estas arqueas puede explicar la baja emisión de CH_4 en el suelo control independientemente del tipo de riego (agua o vinaza). Sin embargo, en el suelo vinaza con vinaza las emisiones de CH_4 fueron ligeramente mayores que en el suelo control ($P < 0.005$) en CRAs de 80% y 100%. Pero en estos suelos el género de arqueas *Methanosarcina* sp. fue encontrado, el cual puede producir CH_4 a partir de compuestos derivados de lignina y aromáticos en condiciones anaerobias (Kato et al., 2015). Esto sugirió que posiblemente en las condiciones del experimento las arqueas de este género predominaron y oxidaron el CH_4 a CO_2.

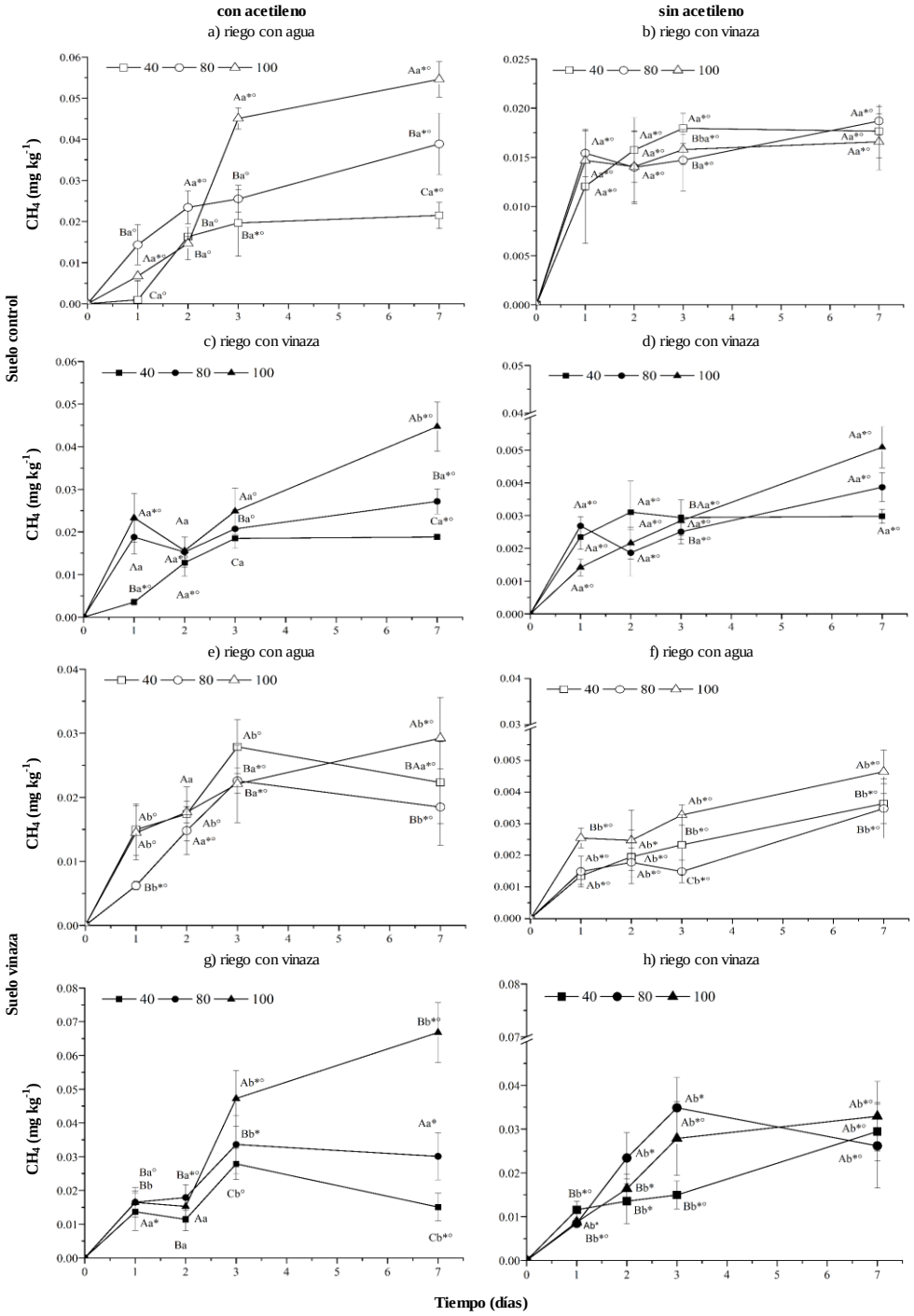


Figura 12. Emisiones de CH_4 en suelo control y vinaza con $P < 0.05$ en $n = 9$. Letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas entre la CRA en el mismo tiempo, mientras que letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas entre el tiempo en la misma CRA. * Denota diferencias significativas entre el riego con agua (A) y vinaza (V). ° Denota diferencias significativas entre tratamientos, con o sin el acetileno.

Esto puede soportar la hipótesis que la aplicación de vinazas al suelo no eleva sustancialmente las emisiones de CH_4, lo cual ha sido reportado con vinazas de azúcar de caña por Soares et al. (2009). Estos autores reportaron que las emisiones de CH_4 no fueron significativas cuando el suelo fue regado con vinazas de azúcar de caña, sin embargo, si fueron significativas cuando el suelo se llevó a condiciones anaerobias por el exceso de riego. Similarmente en el estudio de Goncalves de Oliveira et al. (2013) reportaron que la adición de vinazas de azúcar de caña a el suelo puede generar flujos de CH_4 en un rango de −64.4 a 3.1 y −42.0 a 44.3 μg m^{-2} h^{-1} en un suelo regado con agua y un suelo regado con vinaza respectivamente.

En este trabajo las emisiones de CH_4 por efecto de las vinazas tequileras en SV fueron equivalentes a 25, 50 y 117 μg m^{-2} h^{-1} en tratamientos con acetileno y a CRAs de 40, 80 y 100% respectivamente. En el caso de los tratamientos sin acetileno en SV las emisiones de CH_4 fueron 33, 33 y 50 μg m^{-2} h^{-1} a CRAs de 40, 80 y 100% respectivamente. Las bajas emisiones de CH_4 es posible que sean debidas al consumo de metano por organismos metanotrofas para producir CO_2. Sin embargo esto podría depender del tipo de microorganismo presente en el suelo, tipo de sustrato adicionado, uso de suelo y condiciones de humedad de cada suelo, lo cual puede determinar las emisiones de CH_4 con el riego con vinazas.

Adicionalmente, el análisis de todas las variables (suelo, CRA, tiempo y riego) y sus interacciones mostraron diferencias significativas en las concentraciones de CO_2 producido durante la mineralización o en el experimento de GEI ($P < 0.05$ y < 0.0001) (Tabla 6). Solamente las interacciones de CRA y riego no fueron significativamente diferentes para la mineralización del N ($P = 0.1726$), pero todas las otras variables y sus interacciones fueron significativas ($P < 0.0001$). Las interacciones de suelo con CRA, no tuvieron efecto significativo en las emisiones de N_2O ($P = 0.1379$), mientras que para CH_4 las mismas interacciones ($P = 0.3274$) y suelo con tiempo ($P = 0.1994$), tiempo con riego ($P= 0.1369$), y suelo ($P= 0.3274$) no tuvieron efecto significativo. Las otras variables y sus interacciones tuvieron efectos significativos en las emisiones de N_2O y CH_4.

Tabla 6. Análisis de varianza utilizando PROC GLM (SAS, 1989) para probar las diferencias significativas entre los tratamientos (suelo, CRA, tiempo, tipo de riego) y sus interacciones con la prueba de Tukey (HSD) (Tipo I) sobre la mineralización de CO_2 y Nitrógeno (N min) y emisiones de GEI.

Tratamiento e interacciones	Valor P (Tipo I)				
	Mineralización		GEI		
	CO_2	N min	CO_2	N_2O	CH_4
Suelo	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.1118
CRA	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Tiempo	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Riego	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0024
Suelo × CRA	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.1379	0.3274
Suelo × tiempo	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.1994
Suelo × riego	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0345	<0.0001
CRA × tiempo	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0004	<0.0001
CRA × riego	<0.0001	0.1726	<0.0001	0.0004	0.0294
Tiempo × riego	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.1369
Suelo × CRA × tiempo × riego	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

5.4.4 Estimación de emisiones de GEI

Una estimación de emisiones de GEI (CO_2, N_2O, CH_4) por la aplicación de vinazas a el suelo fue realizada con los resultados encontrados en este estudio y considerando los factores de emisión recomendados por la IPCC (2007). Esta estimación indicó que por cada litro de vinaza de tequila adicionado a el suelo, se puede generar de 1.86 a 17 kg CO_2-eq ha^{-1} $año^{-1}$ (suma de N_2O, CO_2 y CH_4) en CRAs de 40, 80 y 100%. Con el volumen total de vinazas generadas por la industria del tequila (1,760 millones de litros) se podrían generar 132.5 Gg de CO_2-eq, esto representaría el 0.017% de las emisiones que se generan por fertilización química (771,869 Gg de CO_2-eq) y 0.07% por aplicación de estiércol (186,505 Gg de CO_2-eq) (FAO, 2014).

Goncalves de Oliveira et al. (2013), indicaron que al aplicar 200 m^3 de vinaza de azúcar de caña al suelo se produjeron emisiones de 2,387 y 1,525 kg de CO_2 eq ha^{-1} $año^{-1}$ (N_2O, CH_4) en áreas de cultivo de azúcar de caña quemadas y no quemadas respectivamente. Con vinazas de

tequila se podrían generar desde 1,309 kg de CO_2 eq ha^{-1} $año^{-1}$ a 2,058 kg de CO_2 eq ha^{-1} $año^{-1}$ a las misma dosis utilizada por Goncalves de Oliveira et al. (2013) con vinazas de azúcar de caña.

Por otro lado, Thangarajan et al. (2013) reportaron que la adición de enmiendas orgánicas a el suelo contribuyen directamente a las emisiones de GEI a través de la liberación de CO_2, N_2O y CH_4 por la mineralización de compuestos de C y N presentes en estas enmiendas. Estos autores propusieron una ecuación para medir el potencial de emisiones de los GEI cuando se agrega enmiendas orgánicas al suelo considerando la masa y/o el volumen generado de dichos residuos. De acuerdo a la ecuación propuesta por estos autores se calculó el potencial de emisión de CO_2, N_2O and CH_4 de las vinazas tequileras y además el de otro tipo de vinazas como la de azúcar de caña, remolacha y mezcal; y considerando que 1,760 millones de litros de vinaza fueron generados en el 2014 con una densidad de 1.08 kg m^{-3}, y considerando el mismo intervalo de aplicación utilizado en este trabajo (168 a 1652 L ha^{-1} suelo) (Tabla 7).

Al realizar los cálculos correspondiente con la aplicación de vinaza tequilera a CRAs utilizadas en este trabajo (40, 80 y 100%) que corresponden a una dosis de aplicación equivalente a 168, 896 y 1652 L ha^{-1} de suelo respectivamente, se obtuvo que el suelo vinaza irrigado con vinaza (SV-V) en CRAs de 80 y 100% tiene un potencial de 2.9 y 2.8 veces mayor en el total de emisiones que el suelo control irrigado también con vinaza (SC-V) a las mismas CRAs (Tabla 7). Esta diferencia es atribuida a que en el SV se tiene mayor concentración de C y N con respecto al SC, esto debido a la aplicación de vinazas con anterioridad al muestreo, generando una mayor emisión de N_2O y CH_4.

Las emisiones estimadas de GEI por la aplicación de diferentes tipos de vinaza al suelo y con la ecuación descrita en la Tabla 7 indicaron que las vinazas producidas en la industria de etanol por azúcar de caña pueden generar un total de 106.6 a 159.7 millones de toneladas CO_2-C eq $año^{-1}$ mientras que por las vinazas de la industria del tequila se generarían de 0.11 a 0.155 millones de toneladas CO_2-C eq $año^{-1}$. En general, los sistemas agrícolas contribuyen sustancialmente a los flujos globales de CO_2, CH_4 y N_2O, estas actividades adicionan del 10 al 12% del total de las emisiones antropogénicas de GEI, debido a la aplicación de materia orgánica y fertilización del suelo (IPCC, 2007). Los cálculos presentados en este trabajo indicaron un incremento significativo en las emisiones de GEI por la adición de vinazas (Tabla 7).

Tabla 7. Estimación de emisiones de GEI con diferentes tipos de vinaza y las vinazas utilizadas en este trabajo.

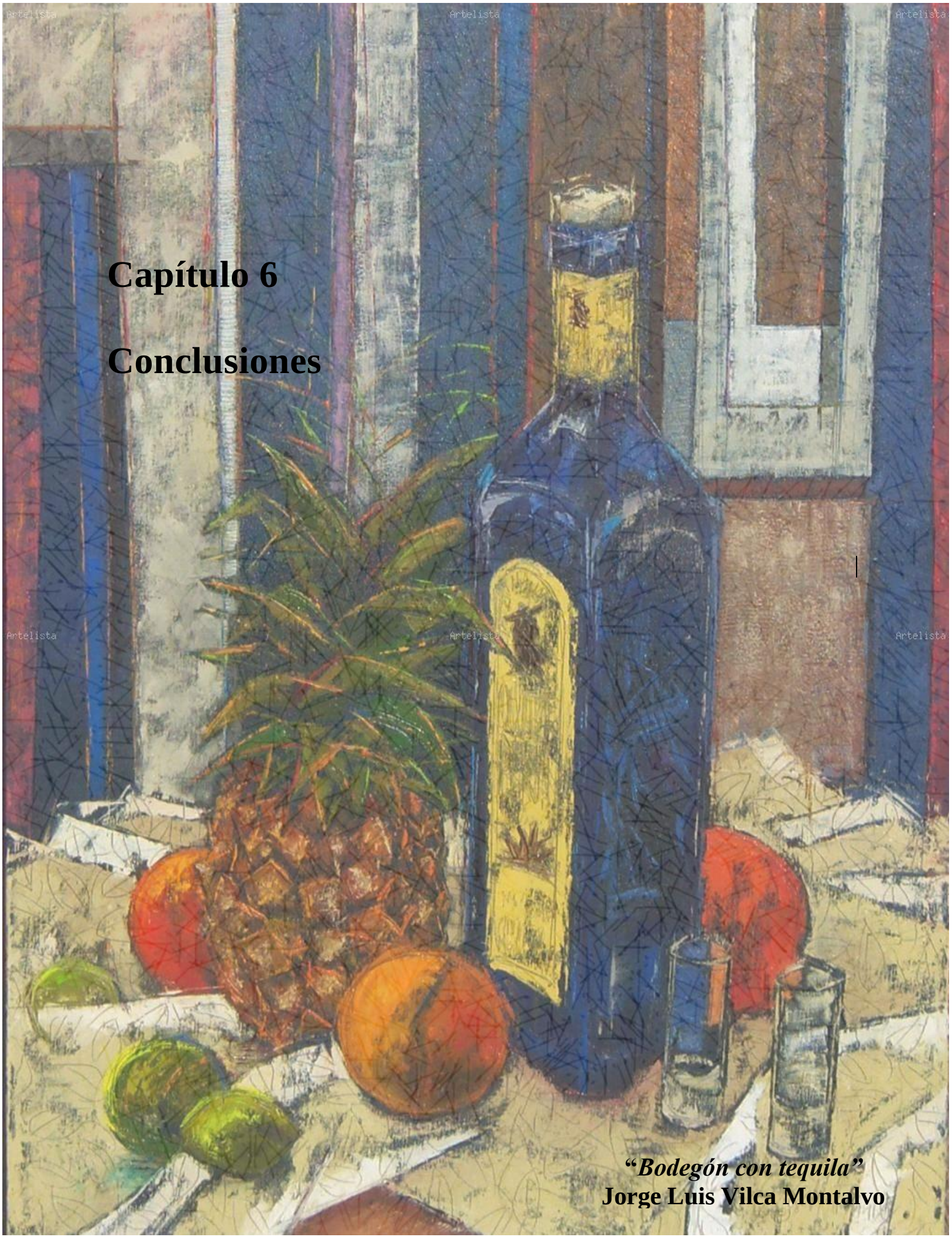
L de vinaza ha^{-1} suelo [a]	Tratamiento	CO_2 [b]	N_2O [c]	CH_4 [c]	Total
		kg CO_2 eq. ha^{-1} $año^{-1}$			
168	SC-V-40	1.7	0.01	0.15	1.86
896	SC-V-80	4	0.4	0.2	4.6
1652	SC- V-100	5	0.8	0.19	6
168	SV-V-40	0.3	0.08	0.73	1.11
896	SV-V-80	5	8	0.9	13.9
1652	SV- V-100	4	12	1	17
Vinaza generada (m^3)	Tipo de vinaza	Millones de toneladas CO_2-C eq $año^{-1}$			
1.4-2.1 x10^9	[d] Azúcar de caña	92 -138	1.4-2.1	13.2-19.7	106.6-159.7
2-3.2 x10^8	[e] Remolacha	13.2-20.6	0.368-0.572	7.3-11.4	20.9-32.6
3.4-3.2 x10^4	[f] Mezcal	0.002 - 0.004	N.S	0.002-0.003	0.004-0.007
1.2-2.1 x10^6	[g] Tequila	0.104 -0.148	9.5×10^{-4}-0.001	0.004-0.006	0.11-0.155

[a)] Dosis aplicada para cada CRA. [b)] Estas emisiones fueron calculadas por la ecuación de Aparecida (2013) CO_2-C (Gg/año) = (((Cantidad Potencial de vinaza producida (Mg/año)) / (potencial de aplicación (t/ha)))*C to CO_2 factor de emisiones (20 C t/ha/año)/1000 y dosis recomendada por Tejeda et al. (2007) 300 m^3/ha; [c)] Se consideró que todo el N y C fue mineralizado; emisiones de CH_4-CO_2-Ceq (Gg/año) = cantidad potencial de vinazas producidas (Mg/año) * %C en vinazas * Conversión de C a CH_4 (1.33)*1/1000*21*factor de emisión de C a CH_4 (1%); N_2O-CO_2-Ceq (Gg/año) = cantidad de vinazas producidas (Mg/año) * %N en vinaza * conversión de N a N_2O (1.57)*1/1000*310 * Factor de emisión de N a N_2O (1.25%); Donde 1.33 es la conversión de C a CH_4; 1% es el factor de emisión de C a CH_4; 21 y 310 son el potencial de calentamiento global para CH_4 y N_2O acorde a la (IPCC, 2007); 1.57 es la conversión de N to N_2O; 1.25% es el factor de emisión de N a N_2O; 1000 es el factor de conversión de Mg a Gg; [)] Goldemberg et al. (2008); [e)] Christodoulou y Bezergianni (2007); [f)] CRM (2015); [g)] CRT (2015).

Finalmente con los resultados obtenidos en este trabajo se puede rechazar la hipótesis de que la adición de materia orgánica por medio de vinazas tequileras favorecería la mineralización de N en el suelo durante el proceso de nitrificación. Sin embargo, la mineralización del carbono fue favorecida con la adición de vinazas. Por otra parte se aprueba la hipótesis de que los procesos de desnitrificación y la generación de gases con efecto invernadero (CO_2, N_2O y CH_4) aumentarían con la adición de vinazas al suelo.

Capítulo 6

Conclusiones



"Bodegón con tequila"
Jorge Luis Vilca Montalvo

6 Conclusiones

Las conclusiones para éste trabajo fueron las siguientes:

I. La legislación actual en México presenta un déficit en los parámetros que regula para la aplicación de aguas residuales al suelo, tales como DQO, NT, MO, ST, fenoles y pH que pueden ser contaminantes y/o afectar los procesos del suelo.

II. Al regar con vinazas tequileras el suelo se promueve la mineralización del carbono hasta 11 veces más que cuando se riega con agua. Además, se promueve la inmovilización del nitrógeno, lo que impide que este N no esté disponible en forma de NH4+ o NO3- .

III. Las emisiones de GEI se promueven cuando se irriga el suelo con vinazas tequileras generando de 1.9 a 17 kg of CO_2-eq ha-1 año-1 (suma de CO_2, N_2O y CH_4) por cada litro de vinaza que se adicione al suelo. Las emisiones van a depender de la presencia de arqueas como *Euryarchaeote* sp. *Metthanosarcina* sp. que se encontraron en este estudio

Capítulo 7

Recomendaciones

"Tequila bottle with limes & salt"
Jean Grenier

7 Recomendaciones

Las recomendaciones que se sugieren derivadas de éste trabajo son las siguientes:

I. Promover una nueva normativa o modificar la actual para la aplicación de aguas residuales (vinazas) en cultivos agrícolas ya que la actual no establece límites para parámetros como el caso de DQO, ST y fenoles por mencionar algunos.

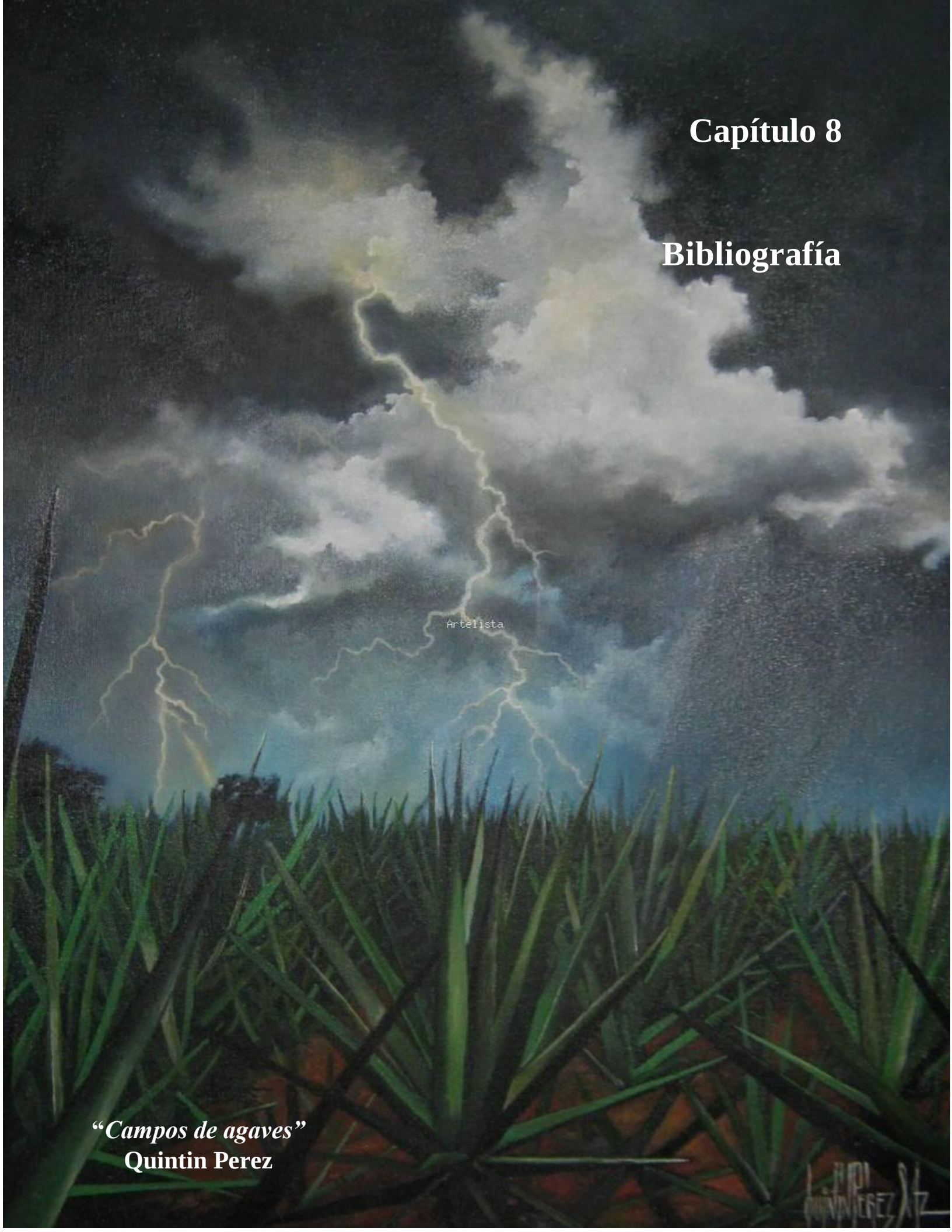
II. Comparar la mineralización del C y N generada por el riego de vinazas tequileras con los fertilizantes industriales más utilizados.

III. Evaluar los cambios de las poblaciones bacterianas generados por la adición frecuente de vinazas tequileras en un suelo agrícola.

IV. Llevar a cabo experimentaciones in situ en cultivos agrícolas irrigados con vinazas tequileras para tener cuantificaciones de las emisiones de GEI en campo.

Capítulo 8

Bibliografía



"Campos de agaves"
Quintin Perez

8 Bibliografía

Abbott, L.K., Murphy, D.V., 2007. What is solil biological fertility, in: Springer (Ed.), Soil Biological fertility - A key ti systainable land use in agriculture, pp. 1-15.

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.

Andreoni, V., Cavalca, L., Rao, M.A., Nocerino, G., Bernasconi, S., Dell'Amico, E., Colombo, M., Gianfreda, L., 2004. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. Chemosphere 57, 401-412.

Aparecida-Christofoletti, C., Pedro-Escher, J., Evangelista-Correia, J., Urbano-Marinho, J.F., Fontanetti, C.S., 2013. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. Waste Manage. 33, 2752-2761.

Baoqing, C., Enke, L., Qizhuo, T., Changrong, Y., Yanqing, Z., 2014. Soil nitrogen dynamics and crop residues. A review. Agron. Sustain. Dev. 34, 429-442.

Baraniecki, C.A., Aislabie, J., Foght, J.M., 2002. Characterization of sphingomonas sp. Ant 17 an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from antartic soil. Microb Ecol 43, 44-54.

Bartha, R., Pramer, D., 1965. Features of a flask method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in the soil. Soil Science 100, 68-70.

Bautista-Zúñiga, F., Durán-de-Bazúa, M.d.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.

Becerra-Castro, C., Rita-Lopes, A., Vaz-Moreira, I., Silva, E.F., Manaia, C.M., Nunes, O.C., 2015. Wastewater reuse in irrigation: A microbiological perspective on implications in soil fertility and human and environmental health. Environ. Int. 75, 117-135.

Bellido, C., Infante, C., Coca, M., Gonzalez-Benito, G., Lucas, S., Garcia-Cubero, M.T., 2015. Efficient acetone-butanol-ethanol production by Clostridium beijerinckii from sugar beet pulp. Bioresour. Technol. 190, 332-338.

Bertrand, J.-C., Bonin, P., Caumette, P., Gattuso, J.-P., Grégori, G., Guyoneaud, R., Le Roux, X., Matheron, R., Poly, F., 2015. Biogeochemical Cycles, in: Jean-Claude Bertrand, P.C., Philippe Lebaron, Robert Matheron, Philippe Normand, Télesphore Sime-Ngando (Ed.), Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications. Springer Netherlands, Netherlands, pp. 511-617.

Bottinelli, N., Jouquet, P., Capowiez, Y., Podwojewski, P., Grimaldi, M., Peng, X., 2015. Why is the influence of soil macrofauna on soil structure only considered by soil ecologists? Soil Till. Res. 146, 118-124.

Braatz, S., Kandiah, A., 1996. utilización de aguas residuales urbanas para el riego de árboles y bosques. Revista Internacional de silvicultura e industrias forestales 47.

Bremner, J.M., 1997. Sources of nitrous oxide in soils. Nutr. Cyci. Agroecosys 49, 7-16.

Brookes, P.C., Kragt, J.F., Powlson, D.S., Jenkinson, D.S., 1985. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen the effects of fumigation time and temperature. Soil Biol. Biochem. 17, 831-836.

Buscot, F., Varma, A., 2005. Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions. Springer Germany.

Cabrera, M.L., 2007. Mineralización y Nitrificación: Procesos claves en el ciclo del nitrógeno. Informaciones Agrónomicas 34, 1-8.

Calegari, A., Darolt, M.R., Ferro, M., 1998. Towards sustainable agriculture with a no-tillage system. Adv. Geoecol. 31.

Campbell, R., 1987. Estructura y dinámica de las poblaciones microbianas en el suelo, in: Limusa (Ed.), Ecología microbiana, México, pp. 109-152.

Carmo, J.B., Filoso, S., Zotelli, L.C., De Sousa Neto, E.R., Pitombo, L.M., Duarte-Neto, P.J., Vargas, V.P., Andrade, C.A., Gava, G.J.C., Rossetto, R., Cantarella, H., Neto, A.E., Martinelli, L.A., 2012. Infield greenhouse gas emissions from sugarcane soils in Brazil: effects from synthetic and organic fertilizer application and crop trash accumulation. Glob. Change Biol. Bioenergy 5, 267–280.

CETESB, 2006. Vinhaça: critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola, in: Paulo, C.A.d.E.d.S. (Ed.), Norma Técnica P4.231, São Paulo.

Clinton, P.W., Newman, R.H., Allen, R.B., 1995. Immobilization of 15N in forest litter studied by 15N CPMAS NMR spectroscopy. Eur. J. Soil Sci. 46, 551-556.

Conde-Bueno, P., Martín-Rubí, J.A., García-Giménez, R., Jiménez-Ballesta, R., 2009. Impacts caused by the addition of wine vinasse on some chemical and mineralogical properties of a Luvisol and a Vertisol in La Mancha (Central Spain). Journal Soils Sediments 9, 121-128.

CRT, 2015. Consejo Regulador del Tequila. Información Estadística, Guadalajara, Jalisco.

Christodoulou, P., Bezergianni, S., 2007. The Competitiveness of Bioethanol Production from Sugar Beet, in: Warnemünde, R. (Ed.), Proceedings of Gen. Assembly Mtng of Internatl Commission for Sugar Technolo g y - C I T S, pp. 1-9.

Daney, J., Top, C., 2002. Methods of Soil Analysys, Part. 4 Physical Methods. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.

Dendooven, L., Bonhomme, E., Merckx, R., Vlassak, K., 1998. Injection of pig slurry and its effects on dynamics of nitrogen and carbon in a loamy soil unter laboratory conditions. Biol. Fert. Soils 27, 5-8.

Domingo-Santos, J.M., Fernández de Villarán- San Juan, R., Corral Pazos de Provens, E., 2006. Estimación de la capacidad de retención de agua en el suelo: revisión del parámetro CRA. Invest Agrar: Sist Recur For 15, 14-23.

España-Gamboa, E., Mijangos-Cortes, J., Barahona-Perez, L., Dominguez-Maldonado, J., Hernández-Zarate, G., Alzate-Gaviria, L., 2011. Vinasses: characterization and treatments. Waste Manage Res 29, 1235-1250.

Exley, C., 2003. A biogeochemical cycle for aluminium? J. Inorg. Biochem. 97, 1-7.

FAO, 2014. Statistical Data Warehouse, in: Food and Agriculture Organization of the United Nations (Ed.). http://data.fao.org/es/statistics.

Frankenberger, W.T., Abdelmagid, H.M., 1985. Kinetic parameters of nitrogen mineralization rate of leguminous crops incorporated into soil. Plant Soil 87, 257-271.

Gallego, V., Sanchez-Porro, C., Garcia, M.T., Ventosa, A., 2006. Massilia aurea sp. nov., isolated from drinking water. Int. J. Sys.t Evol. Microbiol. 56, 2449-2453.

Geisseler, D., Horwath, W.R., Joergensen, R.G., Ludwig, B., 2010. Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms - A review. Soil Bioloy & Biochemistry 42, 2058-2067.

Gisi, U., Schenker, R., Schulin, R., Stadelmann, F., Sticher, H., 1997. Bodenökologie, 2nd ed. Thieme, Stuttgart, New York.

Goldemberg, J., Teixeira-Coelho, S., Guardabassi, P., 2008. The sustainability of ethanol production from sugarcane. Energy Policy 36, 2086-2097.

Goncalves de Oliveira, B., Nunes-Carvalho, J.L., Pellegrino-Cerri, C.E., Clemente-Cerri, C., Feigl, B.J., 2013. Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas. Geoderma 200-201, 77-84.

Herrmann, A.M., Witter, E., Kätterer, T., 2007. Use of acetylene as a nitrification inhibitor to reduce bioses in gross N transformation rates in a soil showing rapid disappearance of added ammonium. Soil Biol. Biochem. 39, 2390-2400.

Hu, H.-W., Zhang, L.-M., Yuan, C.-L., He, J.-Z., 2013. Contrasting Euryarchaeota communities between upland and paddy soils exhibited similar pH-impacted biogeographic patterns. Soil Biology and Biochemistry 64, 18-27.

INEGI, 2014. Mapa Digital de México. Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

Iñiguez, G., Acosta, T.N., Martínez, C.L., Parra, J., González, Q., 2005. Utilización de subproductos de la industria tequilera. Parte 7. Compostaje de bagazo de agave y vinazas tequileras. Rev. Int. Contam. Ambient. 17, 37-50.

IPCC, 2007. Climate change 2007. The physical science basis: contribution of working group I to the IV assessment report of the intergovernmental panel on climate change, in: Cambridge (Ed.). https://www.ipcc.ch/publications_and_data/publications_and_data_reports.shtml, UK Cambridge University Press.

Jenkison, D.S., Powlson, D.S., 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. Soil Biology & Biochemistry 8, 209-213.

Jiménez, A.M., Borja, R., Martín, A., 2003. Aerobic /anaerobic biodegradation of beet molasses alcoholic fermentation wastewater. Process Biochem. 38, 1275-1284.

Kanner, D., Bartha, R., 1979. Growth of *Nocardia rhodochromun* on acetylene gas. J. Bacteriol. 139, 225-230.

Kato, S., Chino, K., Kamimura, N., Masai, E., Yumoto, I., Kamagata, Y., 2015. Methanogenic degradation of lignin-derived monoaromatic compounds by microbial enrichments from rice paddy field soil. Sci Rep 5, 14295.

Khalil, K., Mary, B., Renault, P., 2004. Nitrous oxide production by nitrification and denitrification in soil aggregates as affected by O_2 concentration. Soil Biol. Biochem. 36, 687-699.

Laime, E.M.O., Fernandes, P.D., Oliveira, D.C.S., Freire, E.A., 2011. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. R. Trop. Ci. Agr. Biol. 5, 16-29.

Lamas-Robles, R., 2004. Industria tequilera, visión y tecnología de su desarrollo, in: AC, G.-M. (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.

Li, L.-l., Li, S.-t., 2014. Nitrogen Mineralization from Animal Manures and Its Relation to Organic N Fractions. J. Integr. Agric. 13, 2040-2048.

Linerio-Gil, J.E., Guzmán-Carrillo, A., 2004. Tratamiento de efluntes y aprovechamiento de residuos, in: AC, G.-M. (Ed.), Ciencia y tecnología del tequila, Avances y perspectivas. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnoología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Guadalajara, Jalisco, México, pp. 258-284.

López-López, A., Davila-Vazquez, G., León-Becerril, E., Villegas-García, E., Gallardo-Valdez, J., 2010. Tequila vinasses: generation and full scale treatment processes. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology 9, 109-116.

Luna-Guido, M.L., Vega, J., Ponce-Mendoza, A., Hernández-Hernández, H., Montes, M.C., Dendooven, L., 2003. Mineralization of ^{14}C-labelled maize in alkaline saline soils. Plant Soil 250, 29-38.

Maddela, N.R., Masabanda, M., Leiva-Mora, M., 2015. Novel diesel-oil-degrading bacteria and fungi from the Ecuadorian Amazon rainforest. Water. Sci. Technol. 71, 1554-1561.

Madejón, E., López, R., Murillo, J.M., Cabrera, F., 2001. Agricultural use of three (sugarbeet) vinasse composts: effect on crops and chemical properties of a Cambisol soil in the Guadalquivir river valley (SW Spain). Agriculture, Ecosystems and Environment 84, 55-65.

Madrid, L., Díaz-Barrientos, E., 1998. Release of metals from homogenous soil columns by wastewater from an agricultural industry. Environ. Pollut. 101, 43-48.

Marino-Marmolejo, E.N., Corbala-Robles, L., Cortez-Aguilar, R.C., Contreras-Ramos, S.M., Bolanos-Rosales, R.E., Davila-Vazquez, G., 2015. Tequila vinasses acidogenesis in a UASB reactor with Clostridium predominance. SpringerPlus 4, 419.

Moraes, S.B., Junqueira, T.L., Pavanello, L.G., Cavalett, O., Mantelatto, P.E., Bonomi, A., Zaiat, M., 2014. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? Appl. Energy 113, 825-835.

Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O., 2006. Microbiologia e bioquímica do solo. Editora UFLA, Lavras, segunda edição.

Mulvaney, R.L., 1996. Nitrogen inorganic forms, in: Sparks, D.L. (Ed.), Methods of Soils Analysis Chemical Methods. Part 3. Soil Science Society of America Inc. American Society of Agronomy Inc, Madison, WI, USA, pp. 1123-1184.

Muñoz, C., Paulino, L., monreal, C., Zagal, E., 2010. Greenhause gas (CO_2 and N_2O) emissions from soils: a review. Chil. J. Agr. Res. 70, 485-497.

Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59, 695-700.

Nesbit, S.P., Breitenbeck, G.A., 1992. A laboratory study of factors influencing methane uptake by soils. Agric. Ecosyst. Environ. 41, 39-54.

Nicol, G.W., Schleper, C., 2006. Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? Trends. Microbiol. 14, 207-212.

Nishio, T., Fujimoto, T., 1990. Kinetics of nitrification of various amounts of ammonium added to soils. Soil Biol. Biochem. 22, 51-55.

NMX-FF-109-SCFI-2007, Humus de lombriz (Lombricomposta) especificaciones y métodos de prueba, p. 14.

NOM-021-RECNAT, 2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis, in: SEMARNAT (Ed.), Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario oficial de la Federación, México, D.F.

Núñez-Zofío, M., Larregla, S., Garbisu, C., Guerrero, M.M., Lacasa, C.M., Lacasa, A., 2013. Application of sugar beet vinasse followed by solarization reduces the incidence of Meloidogyne incognita in pepper crops while improving soil quality. Phytoparasitica 41, 181-191.

Oliveira, B.G., Carvalho, J.L.N., Cerri, C.E.P., Cerri, C.C., Feigl, B.J., 2013. Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas. Geoderma 200–201, 77–84.

Osman, K.T., 2013. Soils Principles, Properties and Management, New York London.

Parnaudeau, V., Condom, N., Oliver, R., Cazevieille, P., Recous, S., 2008. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. Bioresour. Technol. 99, 1553–1562.

Ramirez-Fuentes, E., Lucho-Constantino, C., Escamilla-Silva, E., Dendooven, L., 2002. Characteristics, and carbon and nitrogen dynamics in soil irrigated with wastewater for different lengths of time. Bioresour. Technol. 85, 179-187.

Ribeiro, B.T., Lima, J.M., Guilherme, L.R.G., Julião, L.G.F., 2010. Lead sorption and leaching from an Inceptisol sample amended with sugarcane vinasse. Sci. Agric. 67, 441-447.

Robles-González, V., Galíndez-Mayera, J., Rinderknecht-Seijasb, N., Poggi-Varaldoc, H.M., 2012. Treatment of mezcal vinasses: A review. J. Biotechnol. 157, 524-546.

Rodriguez, V., Valdez-Perez, M.d.l.A., Luna-Guido, M., Ceballos-Ramirez, J.M., Franco-Hernández, O., van Cleemput, O., Marsch, R., Thalasso, F., Dendooven, L., 2011. Emission of nitrous oxide and carbon dioxide and dynamics of mineral N in wastewater sludge, vermicompost or inorganic fertilizer amended soil at different water contents: a laboratory study. Appl. Soil Ecol. 49, 263-267.

Rosner, B.M., Rainey, F.A., Kroppenstedt, R.M., Schink, B., 1997. Acetylene degradation by new isolates of aerobic bacteria and comparison of acetylene hydratase enzymes. FEMS Microbiol. Lett. 148, 175-180.

Roth, C.H., 1985. Infiltrabilität von Latosolo-Roxo-Böden in Nordparaná, Brasilien, in Roth, C.H. Feldversuchen zur Erosionskontrolle mit verschiedenen Bodenbearbeitungs-systemen und Rotationen. Göttinger Bodenkundliche Berichte 83, 1-104.

Ruíz-Valdiviezo, V.M., luna-Guido, M., Galzy, A., Gutiérrez-Miceli, F.A., Dendooven, L., 2010. Greenhouse gas emissions and C and N mineralization in soils of Chiapas (Méxcio) amended with leaves of Jatropha curcas L. Appl. Soil Ecol. 46, 17-25.

Santos, c., Lucas, M., S. Lucas, Dias, A.A., Bezerra, R.M.F., Peres, J.A., Sampaio, A., 2014. In the case of sugarcane is estimated that approximately 10-15 L of vinasse is produced per liter of ethanol. chemosphere 117, 53-58.

Schjonning, P., Christensen, B.T., Carstensen, B., 1994. Physical and chemical properties of a sandy loam receiving animal manure, mineral fertilizer or no fertilizer for 90 years. Eur. J. Soil Sci. 45, 257-268.

Schlesinger, W.H., 1997. Biogeochemistry, San Diego.

Schmidt, O., Horn, M.A., Kolb, S., Drake, H.L., 2015. Temperature impacts differentially on the methanogenic food web of cellulose-supplemented peatland soil. Environ. Microbiol. 17, 720-734.

Serrano-Silva, N., Luna-Guidoa, M., Fernández-Luqueño, F., Marscha, R., Dendooven, L., 2011. Emission of greenhouse gases from an agricultural soil amended with urea: A laboratory study. Appl. Soil Ecol. 47, 92-97.

Soares, L.H.B., Alves, B.J.R., Urquiaga, S., Boddey, R.M., 2009. Mitigação das emissões de gases efeito estufa pelo uso de etanol da cana-de-açúcar produzido no Brasil. Circular Técnica 27, 1-14.

Spang, A., Poehlein, A., Offre, P., Zumbragel, S., Haider, S., Rychlik, N., Nowka, B., Schmeisser, C., Lebedeva, E.V., Rattei, T., Bohm, C., Schmid, M., Galushko, A., Hatzenpichler, R., Weinmaier, T., Daniel, R., Schleper, C., Spieck, E., Streit, W., Wagner, M., 2012. The genome of the ammonia-oxidizing Candidatus Nitrososphaera gargensis: insights into metabolic versatility and environmental adaptations. Environ. Microbiol. 14, 3122-3145.

Tchobanoglous, G., Burton, F.L., Stensel, H.D., 1991. Wastewater engineering, treatment and reuse by Metcalf & Eddy, New York.

Tejada, M., García-Martínez, A.M., Parrado, J., 2009. Effects of a vermicompost composted with beet vinasse on soil properties, soil losses and soil restoration. Catena 77, 238-247.

Tejada, M., Moreno, J.L., T, H.M., Garcia, C., 2007. Application of two beet vinasse forms in soil restoration: Effects on soil properties in and environment in southern Spain. Agric. Ecosyst. Environ. 119, 289-298.

Teuscher, H., Adler, R., 1960. The Soil and its Fertility. Reinhold Publishing Corporation, New York.

Thangarajan, R., Bolan, N.S., Tian, G., Naidu, R., Kunhikrishnan, A., 2013. Role of organic amendment application on greenhouse gas emission from soil. Sci. Total Environ. 465, 72-96.

Thompson, L.M., 1952. Soils and Soil Fertility. McGraw-Hill bood company, inc, New York, USA.

Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D'Antonio, C., Dobson, A., Howarth, R., Schindler, D., Schlesinger, W.H., Simberloff, D., Swackhamer, D., 2001. Forecasting agriculturally driven global environmental change. Science 292, 281–284.

Trinsoutrot, I., Recous, S., Bentz, B., Lineres, M., Cheneby, D., Nicolardot, B., 2000. Biochemical quality of crop residues and carbon and nitrogen mineralization kinetics under nonlimiting nitrogen conditions. Soil Sci. Soc. Am. J. 64, 918-926.

Uehara, G., Gillman, G., 1981. The mineralogy, chemistry and physics of tropical soils eith variable charge clays. Westview Press, Boulder, CO.

Vlyssides, A., Barampouti, E.M., Mai, S., Stamatoglou, A., Tsimas, E., 2010. Alternative biological systems for the treatment of vinasse from wine. Water. Sci. Technol. 62, 2899-2904.

Volant, A., Desoeuvre, A., Casiot, C., Lauga, B., Delpoux, S., Morin, G., Personne, J.C., Hery, M., Elbaz-Poulichet, F., Bertin, P.N., Bruneel, O., 2012. Archaeal diversity: temporal variation in the arsenic-rich creek sediments of Carnoules Mine, France. Extremophiles 16, 645-657.

Wrage, N., Velthof, G.L., van Beusichem, M.L., Oenema, O., 2001. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. Soil Biol. Biochem. 33, 1723-1732.

WRB, 2015. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps, in: base, W.r. (Ed.), World soil resources reports. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, p. 192.

Yao, H., Conrad, R., Wassmann, R., Neue, H.U., 1999. Effect of soil characteristics on sequential reduction and methane production in sixteen rice paddy soils from China, the Philippines, and Italy. Biogeochemistry 47, 269–295.

Yu, Y., Lee, C., Kim, J., Hwang, S., 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. Biotechnol Bioeng 89, 670-679.

Zhu, T., Zhang, J., Yang, W., Cai, Z., 2013. Effects of organic material amendment and water content on NO, N_2O, and N_2 emissions in a nitrate-rich vegetable soil. Biol. Fert. Soils 49, 153-163.