

Influencia de la aplicación de vinaza en la estructura de comunidades bacterianas en un *Entic dystropept* y un *Fluentic haplustoll* del Valle del Cauca, Colombia

Influence of the application of vinasse in the structure of bacterial communities on an *Entic dystropept* and a *Fluentic haplustoll* of the Valle del Cauca, Colombia

Influência da aplicação de vinhaça sobre a estrutura das comunidades bacterianas em um Entic dystropept e um Fluentic haplustoll do Valle del Cauca, Colombia

Sandra Patricia Montenegro Gómez¹, Juan Carlos Menjivar Flóres² & Donald Riascos³

¹Licenciada en Biología y Química, Especialista en manejo y conservación de suelos y aguas, Magister en ciencias agrarias, énfasis suelos, Doctora en Ciencias área de concentración microbiología Agrícola. ²Ingeniero Agrónomo, Magister en Suelos y Aguas, Doctor en Ciencia del Suelo.

³Agrónomo del Trópico Húmedo, Magister en ciencias agrarias, énfasis fitopatología.

^{1, 2}Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira.

³ Programa de Agronomía. Universidad del Pacífico. Colombia.

¹spmontenegrog@palmira.unal.edu.co, ²jcmenjivar@unal.edu.co, ³dhriascoso@gmail.com

Resumen

Se evaluó el efecto de aplicación de vinaza y potasio sobre la estructura de comunidades bacterianas de maíz dulce (*Zea mays*) en un *Entic dystropept* y en un *Fluentic haplustoll* del Valle del Cauca, Colombia. Se siguió un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos y cinco repeticiones: T1 (100% requerimiento de K⁺ con KCl), T2 (100% requerimiento de K⁺ con vinaza), T3 (50% requerimiento de K⁺ con KCl +50% con vinaza) y T4 (25% requerimiento de K⁺ con KCl +75% con vinaza). Se estableció la relación entre estructuras de comunidades microbianas y aplicación de vinaza por el método PCR-DGGE de amplicones del gen rRNA 16S. El T1 y T2 del *Entic dystropept* presentó mayor número de amplicones y el análisis clúster de distancia euclidiana indicó que existe similitud de comunidades bacterianas en estos tratamientos donde

tanto la vinaza como KCl fueron aplicados para suplir el 100% de fuente de potasio

Palabras clave: Inceptisol; Mollisol; PCR-DGGE, Vinaza, comunidades microbianas

Abstract

The effect of vinasse application on the structure of bacterial communities in a *Entic Dystropept* and a *Fluentic haplustoll* Cauca Valley, Colombia was evaluated. to meet the requirements of K⁺ crop of sweet corn (*Zea mays* L.). Experimental design was completely randomized with four treatments and five replications: T1 (100% requirement of K + KCl), T2 (100% requirement of K + with vinasse), T3 (50% requirement of K + KCl + 50% with vinasse) and T4 (25% requirement of K + KCl + 75% with vinasse). The relationship between microbial

community structure and application of vinasse by PCR-DGGE method 16S rRNA gene amplicons was established. The T1 and T2. Entic dystropept showed higher number of amplicons and Euclidean distance cluster analysis, indicate that there similarity of bacterial communities in these treatments where both vinasse as KCl were applied to supply 100% of source of potassium

Key-words: Inceptisol; Mollisol; PCR-DGGE, stillage, microbial communities

Resumo

O efeito da aplicação de vinhaça sobre a estrutura das comunidades bacterianas em um Entic Dystropept e um Fluventic haplustoll no Vale do Cauca, na Colômbia, foi avaliado. para atender aos requisitos de K⁺ safra de milho doce (*Zea mays* L.).

O delineamento experimental foi trazado, com quatro tratamentos e cinco repetições: T1 (100% exigência de K⁺, KCl), T2 (100% de exigência de K⁺ com vinhaça), T3 (50% exigência de K⁺ KCl + 50% com vinhaça) e T4 (25% exigência de K⁺ KCl + 75% com vinhaça). Foi estabelecida a relação entre a estrutura da comunidade microbiana e aplicação de vinhaça por amplicons do gene 16S rRNA a través deo metodo PCR-DGGE. Os tratamentos T1 e T2 do Entic dystropept apresentaram maior número de amplicons e a análise de agrupamento de distancia euclidiana indicou similaridade da comunidade bacteriana nestes tratamentos, onde tanto a vinhaça como KCl foram aplicados para suprir 100% da fonte de potássio.

Palavras-chave: Inceptisol; Mollisol; PCR-DGGE, a vinhaça, comunidades microbianas

Introduccion

La vinaza es el principal residuo de la industria sucroenergetica. La relación entre producción de etanol/vinaza es aproximadamente 3:1. De acuerdo a un reporte del Grupo de Investigación en Eficiencia Energetica y Energias Alternativas (GEAL), durante el 2011 los ingenios azucareros del valle geográfico del río Cauca produjeron 351 millones de litros de bioetanol, generando alrededor de 877.5 millones de litros de vinaza, los investigadores argumentan que este volumen va en aumento de acuerdo a la política nacional de oxigenación de la gasolina. La vinaza presenta pH bajo, altos valores de DQO y DBO₅, gran contenido de sólidos en suspensión, entre otros, por ello se considera como un residuo líquido que impacta negativamente el ambiente. (Bermúdez, Hoyos & Rodriguez, 2000; Larrahondo, 2009; y Korndorfer, 2009). La resolución 0100-.Nº 0630 0081 de 2012, en la cual se reglamenta el uso, manejo, aplicación y almacenamiento de las vinazas, y de los productos que de ella se deriven, en el área de jurisdicción de la corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca-CVC, indica que para tal fin es necesario establecer directrices, metodologías,

criterios y procedimientos para el monitoreo y seguimiento de actividades relacionadas con estas sustancias con el fin de controlar alteraciones en los recursos naturales, agua, aire y suelo. En relación al suelo, solamente se plantean análisis antes de aplicar los subproductos de vinaza y no posterior a la aplicación que es realmente donde se tiene información del impacto positivo o negativo de esta sustancia. Los análisis previos a la aplicación son bien específicos para la caracterización tanto física como química, en el primer caso son: textura, densidad aparente, macro, meso, microporosidad y porosidad total. Los análisis químicos: pH, materia orgánica, cationes de calcio, magnesio, sodio, potasio, capacidad intercambio catiónico; y para la salinidad especial, conductividad eléctrica, cationes solubles de calcio, magnesio, sodio, potasio, aniones: sulfatos, cloruros, carbonatos, bicarbonatos y metales pesados. Respecto a análisis biológico solo indica que se establecerá una línea base microbiológica sin especificar qué tipo de análisis contempla en relación a la caracterización siendo que ésta puede tener diferentes connotaciones incluyendo conteo, diversidad, actividad metabólica

o estructura de sus comunidades. Según Korndörfer *et al.* (2004) por su alta carga de materia orgánica, la aplicación de vinaza genera cambios temporales en la población de microorganismos del suelo, tal como fue reportado por Neves *et al.* (1983) a través de evaluación *in vitro* donde se observó aumentos substanciales aunque pasajeros en poblaciones de hongos y bacterias, permaneciendo inhibida la población de actinomicetos. Resultados obtenidos en suelos del Valle del Cauca indican que la reducción del espacio poroso en el suelo (densidad aparente $> 1.4 \text{ g cm}^{-3}$) por efecto de la vinaza influye negativamente la actividad de las deshidrogenasas en el tiempo (Narváez *et al.*, 2010); estas enzimas actúan en la degradación de materia orgánica y son importantes indicadores del metabolismo oxidativo y de la actividad microbiana que ocurre en los suelos (Quilchano & Maraño, 2002). Entre los métodos actuales para estudios ambientales se encuentran los moleculares contribuyendo ampliamente en la descripción microbiana a nivel genético, basado en la utilización de ácidos nucleicos tanto ADN como ARN extraído de muestras ambientales, seguido de amplificación del gen de interés por PCR y análisis de amplicones por diversas técnicas como biblioteca de clones, secuenciación, microarreglos, qPCR (real time) y DGGE (fingerprinting) entre otras (HE *et al.*, 2007; Cárdenas & Tiedje, 2008. Gonçalves, 2010). La asociación de las técnicas

PCR (Reacción de polimerasa en cadena) y DGGE (Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante) posibilita amplificar y seleccionar fragmentos de DNA metagenómico microbiano presente en diversos sistemas ambientales. El DNA amplificado es separado de acuerdo a las constituciones de GC (guanina- citosina) de diversos fragmentos, construyendo un perfil de bandas que representan el fingerprinting de la comunidad microbiana, Cambios en la estructura de estas comunidades son reflejadas en el perfil de bandas obtenidas a través de DGGE (Costa, 2010). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de aplicación de vinaza en la estructura de comunidades bacterianas en dos órdenes de suelos del Valle del Cauca, Colombia.

Materiales y métodos

El trabajo tuvo lugar en casa de vegetación de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, Valle del Cauca (N 03° 30' 45.6" y W 76° 18' 29.91", 1050 m.s.n.m., 23°C y 70% de humedad relativa) con dos suelos de bajo contenido de potasio (Tabla 1). Las variables físicas evaluadas fueron densidad aparente, textura, estabilidad de agregados y porosidad total. La vinaza se obtuvo del Ingenio Providencia (Tabla 2).

Tabla 1. Propiedades químicas de los suelos *Entic dystropept* (A) y *Fluventic haplustoll* (B)

	pH 1:1	M.O %	Ca	Mg	K Cmol ⁺ kg ⁻¹	Na	CIC	P	Cu	Zn	Mn ppm	Fe	B
A	5.50	8.10	6.89	2.63	0.21	0.18	14.52	51.00	2.40	11.00	57.21	263.00	0.35
B	7.64	3.84	8.74	3.54	0.20	0.17	11.76	34.90	16.00	3.36	44.13	96.75	0.31

Tabla 2. Composición química de vinaza del 25%

Elemento	Contenido kgm ⁻³
N	0.007
P ₂ O ₅	0.020
K ₂ O	33.91
CaO	1.73
MgO	3.48
SO ₄	0.031
Na	2.236

En el experimento se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos generados a partir de la provisión de los requerimientos nutricionales de K⁺ del maíz dulce (*Zea mays*), con dos fuentes (KCl y vinaza) y los demás requerimientos nutricionales del cultivo para una cosecha de tres a cuatro toneladas por hectárea.

Tabla 3 Mezclas de potasio aplicado antes (50%) y después de floración (50%) del maíz dulce

	Mezclas de potasio
T1	100% KCl
T2	100% vinaza
T3	50% vinaza+50% KCl
T4	75% vinaza+25% KCl

Extracción de ADN total del suelo

Fue utilizado un protocolo de extracción de ADN total del suelo para estudio de diversidad microbiana adaptado por Lambais *et al.* (2005). El procedimiento fue el siguiente: En 0.5 g. de suelo colocados en tubos de 2 mL con tapa rosca, fueron adicionados 1,25 mL de Na₂PO₄ (1 mM – pH 7,0) + SDS 1% posteriormente 0,1 g de PVP (polivinilpirrolidona), se incubó a 30°C por 30 minutos, agitando cada 5 minutos, luego se centrifugó a 12000g por 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante (500µL) fue transferido para un tubo 1,5 (Eppendorf), se adicionaron 50 µL de acetato de potasio (Kac) 5M, invirtiendo 10 veces, se incubó en hielo por 10 minutos. Se centrifugó a 12000g por 5 minutos a temperatura ambiente, luego fue transferido el sobrenadante a un tubo 1,5 (Eppendorf) y se adicionó un mL de etanol absolutamente helado, se mezcló por inversión 10 veces y se centrifugó por 15 minutos a 4°C. Se lavó el pélete con 500 µL de etanol 70% y se centrifugó por 5 minutos a 4°C. Posteriormente el pélete fue sacado a 37°C por 20 minutos y se resuspendió en 50 µL de agua milliQ autoclavada. La cantidad y calidad aproximada de ADN fue confirmada en gel de agarosa al 1%.

Análisis de comunidades microbianas por PCR- DGGE

Los amplicones del gen rRNA 16S fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente desnaturante (DGGE). El DGGE consiste en la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño en un gel de poliacrilamida conteniendo gradiente desnaturante (formamida y urea) (ØVREAS *et al.*, 1997). Las variaciones en la migración de los fragmentos de nucleótidos en el gel son referentes a las diferencias en la concentración de G+C. Los gels de acrilamina: bisacrilamida (37,5 : 1; m:m) 8%, fueron separados con gradiente desnaturante variando de 15 a 55%, utilizando dos soluciones: solución desnaturante 100%, conteniendo 40% (v/v) formamida y 7 M urea, y solución desnaturante 0%, sin urea y formamida (ØVREAS *et al.*, 1997). La electroforesis fue realizada a 60°C e 200 V constantes por 4 horas, en un sistema de electroforesis vertical DCo de (Bio-Rad Laboratories, Rio de Janeiro, BR), utilizando solución tampón TAE 0,5X (20 mM Tris-acetato, 0,5 mM EDTA, pH 8,0). Después de la electroforesis, el gel fue fijado en una solución 10% de ácido acético glacial por 15 minutos. En seguida, el gel fue lavado tres veces con agua destilada, inmerso en solución de metanol 50% por 15 minutos, lavado tres veces con agua destilada e inmerso en solución de

VISTRA-Green I (1:10000; v/v) (GE Healthcare, São Paulo, BR) por 30 minutos. Después de la coloración, el gel fue lavado tres veces en agua destilada y analizado por densitometría, utilizándose un densímetro laser FluorImager (GEHealthcare, São Paulo, BR) y el programa Fragment Analysis (GE Healthcare, São Paulo, BR). Los geles fueron analizados utilizando el programa Diversity Database (Bio-RadLaboratories, Rio de Janeiro, BR).

Para determinación de riqueza de los amplicones de las muestras, se realizó un análisis de similitud entre las estructuras de las comunidades bacterianas a través de concordancia simple ("simple-matching"), usándose el algoritmo de Ward y la distancia euclidiana como medida, a través del programa Systat 12, con base en datos binarios para presencia ó ausencia (1 o 0) de las bandas detectadas después del DGGE.

Resultados

Los suelos estudiados difieren sustancialmente en contenidos de materia orgánica con mayor porcentaje en el *Entic dystropept* (Tabla 1), el pH

de este suelo es ligeramente ácido y el *Fluventic haplustoll* corresponde a un suelo neutro, con ligera tendencia a la basicidad. La densidad aparente del *Entic dystropept* presentó disminución significativa al finalizar el ensayo con respecto a los valores iniciales, por su parte en el *Fluventic haplustoll* se incrementó con valores superiores a 1.4 g cm^3 , con consecuente disminución de la porosidad (Narváez *et al.*, 2010).

La estructura de comunidades bacterianas de cada suelo se observa en las bandas generadas por el DGGE (Figura 1), cada banda en el gel puede representar más de un genotipo bacteriano, por esta razón no es posible establecer una relación directa entre la cantidad de bandas detectadas por DGGE y el número de especies presentes (Lambais *et al.*, 2005), no obstante, es posible tener un panorama general de respuesta microbiana ante un agente externo. La Figura 2 muestra el número de amplicones de cada tratamiento, donde el mayor número fue para T1 y T2, KCl 100% y vinaza 100%, respectivamente.

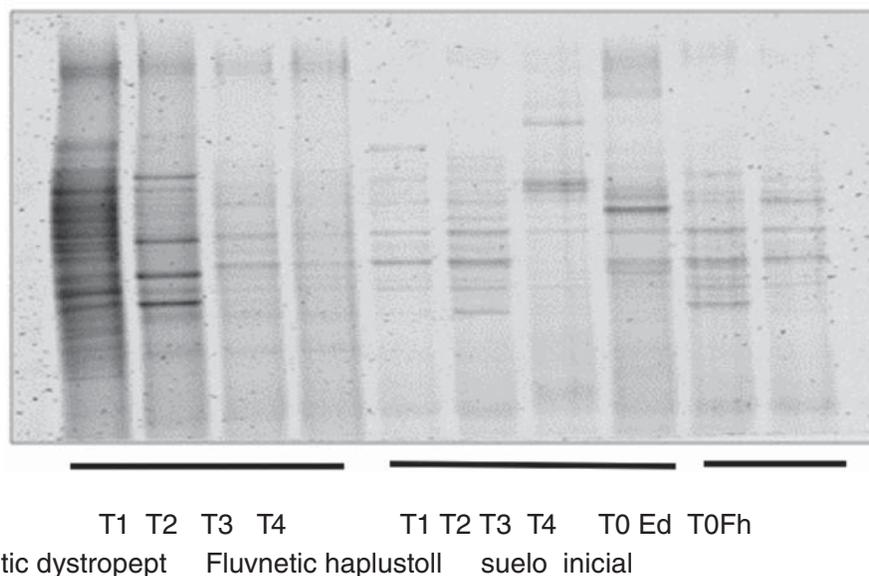


Figura 1. DGGE de amplicones de rRNA 16S de Bacteria en un *Entic dystropept* (Ed) y un *Fluventic haplustoll* (Fh) bajo influencia de aplicación de vinaza T1 (KCl 100%), (T2 vinaza 100%), (T3 KCl 50%, vinaza 50%), (T4 vinaza 75%, KCl 25%). T0 indica ausencia de vinaza en cada orden de suelo.

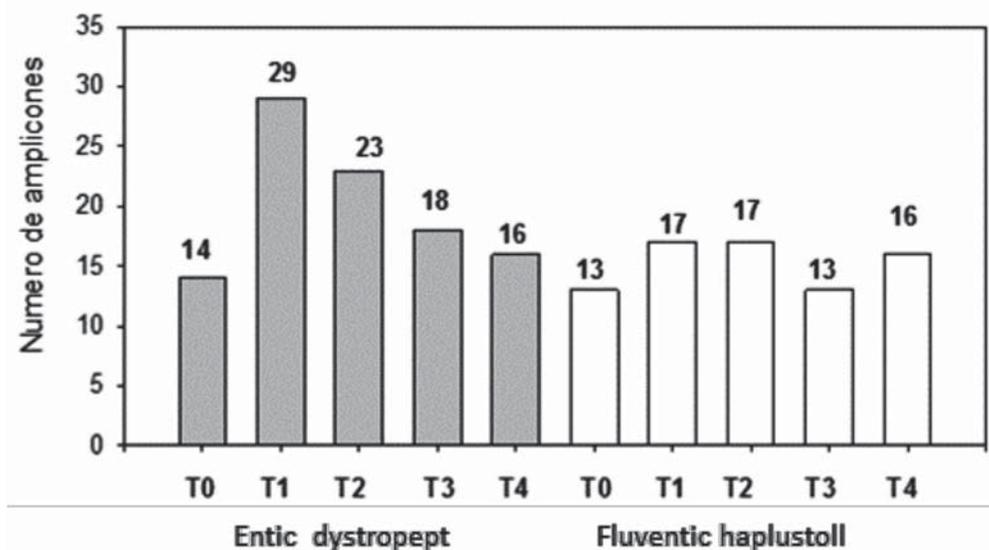


Figura 2. Riqueza de amplicones de rRNA 16S de bacterias por PCR- DGGE presentes en un Entic dystropept y un Fluentic haplustoll bajo influencia de aplicación de vinaza T1 (KCl 100%), (T2 vinaza 100%), (T3 KCl 50%, vinaza 50%), (T4 vinaza 75%, KCl 25%). T0 indica ausencia vinaza en cada orden de suelo.

Los resultados basados en presencia y ausencia de bandas detectadas en el gel DGGE fueron agrupados en un clúster jerárquico (Figura 3). La similitud microbiana basada en los amplicones presentes se analizó a través de la distancia euclidiana.

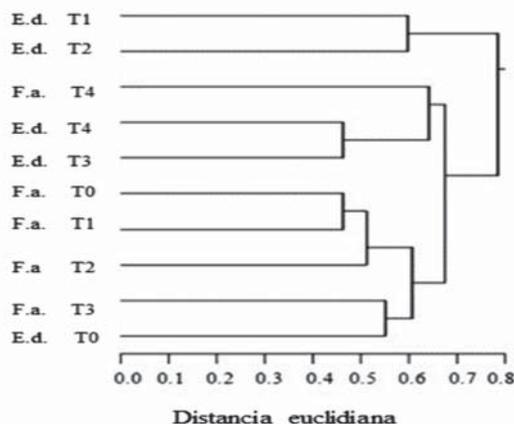


Figura 3. Agrupamiento jerárquico con base en separación de amplicones de rRNA 16S de bacteria por PCR- DGGE presentes en un Entic dystropept (Ed) y un Fluentic haplustoll (Fh) bajo influencia de aplicación de vinaza T1 (KCl 100%), (T2 vinaza 100%), (T3 KCl 50%, vinaza 50%), (T4 vinaza 75%, KCl 25%). T0 indica ausencia de vinaza en cada orden de suelo.

En conjunto con el agrupamiento jerárquico se realizó un análisis multivariado NMDS (Análisis no métrico dimensional con Primer 5), seguido de un análisis de similitud (análisis múltiple de similitud), este análisis se realizó basado en el agrupamiento de las muestras antes y después de aplicación de vinazas y considerando las variables ambientales pH, ma-

teria orgánica y también variables microbiológicas biomasa y actividad microbiana - CO₂ y cociente metabólico qCO₂ (datos no presentados). Los resultados indican de modo general que los suelos fueron agrupados de forma dispersa antes de aplicación de tratamientos y de una forma más estrecha después de aplicación de los mismos (Figura 4).

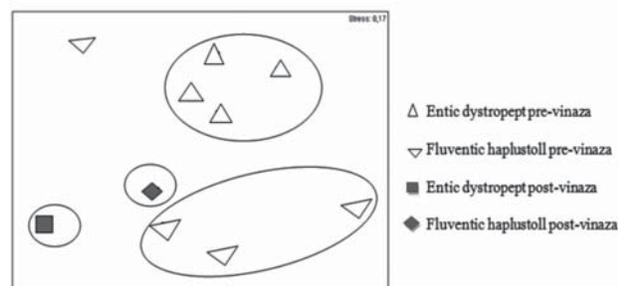


Figura 4. Análisis NMDS con base en separación de amplicones de rRNA 16S de bacteria, pH, materia orgánica, biomasa microbiana-C, respiración microbiana-CO₂, presentes en un *Entic dystropept* y un *Fluentic haplustoll* antes de aplicación de vinaza (pre-vinaza) y después de aplicación (post-vinaza) (T1 KCl 100%), (T2 vinaza 100%), (T3 KCl 50%, vinaza 50%), (T4 vinaza 75%, KCl 25%).

Discusión y conclusiones

Los resultados obtenidos por distancia euclidiana (Figura 3) agrupan los tratamientos T1, T2 del *Entic dystropept* en un solo clúster indicando que no existen diferencias estadísticas entre ellos. El agrupamiento y mayor número de microorganismos bacterianos en los tratamientos mencionados indica que las mezclas no favorecieron su crecimiento, sin embargo es importante considerar el sistema de cultivo ya que en el caso de actividad microbiológica esta se encuentran estrechamente relacionada a los factores suelo-cultivo (Hernández *et al.*, 2003), en este sentido Rosero *et al.*, (2013) reportó en un cultivo de habichuela que la mezcla en cantidades iguales de K y vinaza favoreció la biomasa microbiana en diferentes suelos, en contraste resultados de la actividad de deshidrogenasa reportados por Narváez *et al.*, (2010) en los mismos suelos del presente estudio indican en el *Fluentic Haplustoll* baja actividad de la enzima, argumentando posibles efectos del deterioro físico de este suelo al agregar vinaza, principalmente incremento de la densidad aparente ($D.A. > 1.4 \text{ g cm}^{-3}$) lo cual influye en la reducción del espacio poroso, creando condiciones anaerobias, que además de disminuir la actividad de la biomasa microbiana, afectan el estado metabólico y la producción de enzimas por las células (Tejada, García. Moreno & Hernández, 2007). Estos resultados son concordantes con los

reportados por Montenegro *et al.* (2009) donde microorganismos del suelo *Fluentic haplustoll* se afectaron negativamente en contenido de biomasa microbiana y cociente metabólico ($q\text{CO}_2$), los datos de estas variables biológicas fueron consideradas en el presente estudio para ser correlacionadas con la estructura de comunidades bacterianas (Figura 4), los resultados presentan claramente agrupación dispersa de los tratamientos antes de aplicar vinaza, esta agrupación cambia a una forma compacta cuando se aplica vinaza, lo que sugiere comportamiento de respuesta microbiana a la aplicación de vinaza tanto en el *Entic dystropept* como en el *Fluentic haplustoll*, en este sentido las propiedades del suelo juegan un papel importante ya que siempre va a existir impacto de respuesta, pero en la medida en que las condiciones del suelo estén química, física y biológicamente estables la resiliencia será mayor ante efectos negativos de compuestos presentes en residuos como la vinaza que si bien puede ser benéfico para los microorganismos en algunos casos como T2 del *Entic dystropept* de este estudio, también puede ser muy perjudicial en suelos degradados físicamente.

Los resultados obtenidos en T1 y T2 del *Entic dystropept* indican que existe similitud de comunidades bacterianas en estos tratamientos donde tanto la vinaza como KCl fueron aplicados para suplir el 100% de fuente de potasio

Agradecimientos

Al grupo de investigación en “Uso, manejo de suelos y aguas con énfasis en degradación de suelos” por el soporte técnico, científico y financiero de la Tesis de Maestría de la cual se derivó el artículo. Al Doctor. Nelson Virgilio Piraneque, profesor en la Universidad de Magdalena, por su apoyo tanto en la parte práctica como en el análisis de los resultados aquí presentados los cuales en su mayoría fueron procesados en el laboratorio de microbiología molecular de la Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-Universidad de Sao Paulo, coordinado por el profesor-Doctor Marcio Rodrigues Lambais.

Literatura citada

1. Bermúdez, R., Hoyos, J & Rodríguez, S., (2000) Evaluación de la disminución de la carga contaminante de la vinaza de destilería por ensayo anaeróbico. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 16, pp. 103 – 107
2. Cárdenas, E. & Tiedie, J. M. (2008). New tools for discovering and characterizing microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology*, Amsterdam, v. 19, p. 544-549
3. Costa, C. T. R.C. da. (2010). Comunidade bacteriana, atributos do solo e fluxo de gases em solo sob cerrado e cana de açúcar, 126 p.. (Tesis de maestría) -Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Universidade de Sao Paulo.
4. Gonçalves, B. Vinhaça da cana de açúcar: Fluxos de gases de efeito estufa e as comunidades de archea presente no sedimento do canal de *distribuição* (2010), 96 p. (Tesis de maestría) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo.
5. He, Z., Gemtry, T. J., Schadt, C. W., Wu, L., Liebich, J., Chong, S. C., Huang, Z., Wu, W., Gu, B., Jardine, P., Criddle, C. & Zhou, J. (2007) Geochip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental process. *The ISME Journal*, London, v. 1, p. 67-71.
6. Hernández, W., Rojas, J., Rivero, C., Centeno, A. & Paolini, J. (2003). Efecto de tres sistemas de labranza de un suelo cultivado con maíz (*Zea mays*L.) *Rev. Agron. Maracay*, 29:171 - 18.
7. Korndorfer, G., (2009) Impacto ambiental del uso de la vinaza en la agricultura y su influencia en las características químicas y físicas del suelo. Memorias Seminario internacional de Fertilización y Nutrición de la Caña de Azúcar, Tecnicaña. Cali, Colombia, pp. 115 – 122
8. Korndorfer, Nolla, A., Waldo, A. & Lara, C. (2004) Impacto ambiental del uso de la vinaza en la agricultura y su influencia en las características químicas y físicas del suelo en: Encuentro sobre vinazas, potasio y elementos menores para una agricultura sostenible, Palmira, Colombia, 14 y 15 de mayo de 2004, Corpoica, 233 p.
9. Lambais, M., De Carvalho, J., Baretta, C. & Campos, R. (2005). Diversidade microbiana nos solos: Definindo novos paradigmas. *Tópicos Ci. Solo*, 4:43-84
10. Larrahondo, J., (2009) La vinaza: Caracterización de la vinaza, usos y aprovechamientos potenciales. Memorias Seminario internacional de Fertilización y Nutrición de la Caña de Azúcar, Tecnicaña. Cali, Colombia, pp. 69 – 90.
11. Montenegro, G. S., Menjivar, F. J., Bonilla, C. C. & Mardriñan, M. R. (2009). Influencia de la aplicación de vinaza en la actividad y biomasa microbiana en un *Entic Dystropey* un *Fluventic haplustoll* del Valle del Cauca Colombia. *Acta Agron.* 58(01):41 - 45.
12. Narváez, C. M., Sánchez de P., M. & Menjivar, J. (2010). Efecto de la aplicación de vinazas en las propiedades físicas y la actividad de deshidrogenasas en suelos cultivados con maíz dulce (*Zea mays*L.) *Acta Agronómica, Universidad Nacional de Colombia*, vol. 59, núm. 2, 2010, pp. 211-217.
13. Neves, M., Lima, I. T. & Dobereiner, J. (1983) Efeito da vinhaça sobre a a microflora do solo. En: *Revista Brasileira de ciência do solo*. N° 7 P 131-136
14. Øveras, L., Forney, L. & Frida, L. D. (1997). Distribution of Bacterioplankton in Meromictic Lake Sælenvannet, as Determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragments Coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 3367-3373.
15. Quilchano, C. & Marañón, T. (2002). Dehydrogenase activity in Mediterranean forest. *Soil Biol, Fertile Soils*. 35:102 - 107.
16. Rosero, M., Vargas, W. & Menjivar, J. (2013) Efectos de vinazas sobre bacterias rizosféricas y en la actividad-CO2 y biomasa-C microbiana de un suelo *Pachic Haplustoll*. *Acta Agronomica, Universidad Nacional de Colombia*, vol 62, num 2 2013, p 165-173
17. Tejada, M., Garcia, C., Moreno, J. & Hernandez, M. (2007) Application of two beet vinasse forms in soil restoration: Effects on soil properties in an arid environment in southern Spain. *Agric. Ecol. Environ.* 119:289 - 298.