

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY
CAMPUS ESTADO DE MÉXICO



VERMICOMPOSTEO DEL BAGAZO DE AGAVE (*Agave tequilana*) GENERADO EN LA INDUSTRIA TEQUILERA

TESIS QUE PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN DESARROLLO SOSTENIBLE
PRESENTA

ALICIA ARRIAGA NOGUEZ

Asesor: Dr. Ilangovan Kuppusamy Ammal
Co Asesor: M.C. Ma. del Pilar Bremauntz Michavila

Jurado:	Dr. Javier Ramirez Angulo	Presidente
	Dr. Ilangovan Kuppusamy Ammal	Secretario
	M.C. Ma. del Pilar Bremauntz Michavila	Vocal

Atizapán de Zaragoza, Edo. Méx., Enero 2006.

**A mi hijo Diego, mi mayor motivación,
a mis Hermanos y Amigos,
a mi tío M. en C. Alberto Arriaga Frías...**

AGRADECIMIENTOS

Destilerías “Campanario” y “Espolón” en Arandas, Jalisco. A la Dra. Ma. Patricia Téllez Mora por su tiempo y gran apoyo para el acceso a las destilerías y la obtención de bagazo. Al Ing. Cirilo Oropeza y Hernández y al Ing. Miguel Angel Padilla M. de Tequila Espolón, por su atención, por el acceso a la planta y laboratorio, además del bagazo proporcionado.

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). A la Dra. Josefina Linerio por la información proporcionada para el desarrollo de la presente investigación y por el apoyo en la obtención de las muestras de agave y bagazo.

Laboratorio de Botánica de la Unidad de Morfofisiología y Función. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. A la Dra. Silvia Aguilar Rodríguez por el apoyo en la realización del estudio anatómico del agave e interpretación de las fotografías de MEB.

Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), Texcoco. Por el apoyo en los análisis químicos.

Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT). Por la beca económica otorgada para el desarrollo del presente proyecto de investigación.

En el ITESM-CEM:

Laboratorio de Materiales. Al Ing. José Antonio García Macedo por su tiempo, asesoría y paciencia en la preparación de muestras y uso en general del Microscopio Electrónico de Barrido.

Departamento de Ingeniería Eléctrica y Electrónica. Al Dr. Enrique Chong por el diseño e instalación del sistema electrónico de monitoreo de temperatura y humedad.

Planta Física, por el espacio proporcionado en el Invernadero del Campus.

Este trabajo se realizó en el **Laboratorio del Centro de Investigación en Calidad Ambiental (CICA).** Agradezco de manera especial a la M. en C. Ma. del Pilar Bremauntz por el apoyo constante, las ideas, sugerencias, comentarios, por compartir tus conocimientos y experiencias, por tus valiosos consejos, tu tiempo, ocurrencias... Al Dr. Luis Fernández Linares, por la revisión y sugerencias. Al Dr. Ilangovan Kuppusamy.

RESUMEN

La industria tequilera, de gran importancia para México se enfrenta al problema de generación de una gran cantidad de bagazo de agave como residuo sólido orgánico. El vermicomposteo ha sido una alternativa de aprovechamiento de residuos orgánicos propuesta y aplicada para el bagazo de agave, sin embargo, para las 2.1×10^8 Ton/año generadas, es necesario buscar la eficiencia en el proceso de degradación, para lo cual en el presente trabajo, se establecieron parámetros de control y seguimiento del proceso de vermicomposteo del bagazo de *Agave tequilana* mediante la evaluación del efecto de la gallinaza y tierra negra aplicados en diferentes concentraciones; y al establecimiento del seguimiento del proceso de degradación del bagazo, a través de la técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB), utilizando como herramientas el estudio de la actividad microbiológica en el proceso y el establecimiento de la histología de la piña de *Agave tequilana*. Como resultados se obtuvo la disminución en el tiempo de vermicomposteo a tres meses en las concentraciones (bagazo:tierra:gallinaza): (60:40:0), (70:30:0), (80:20:0) y (80:10:10); se encontró que las lombrices no toleran concentraciones mayores a 10% de gallinaza; y que la concentración (80:20:0) fue la proporción con mayor actividad microbiana y una relación C:N mas estable. En cuanto a actividad microbiológica tanto al inicio, como al final del proceso de vermicomposteo se observó un mayor crecimiento de colonias de bacterias en comparación con las de hongos, sin embargo los hongos predominaron en biomasa al inicio, contrario a la etapa final del proceso en donde se observó una mayor biomasa de bacterias. En el proceso de degradación se reconoció una primer fase donde se degradan las paredes primarias de las células más externas del haz vascular que conforman las fibras de agave, en una segunda fase se observó la degradación de paredes primarias de células internas al haz y la pérdida de arreglo celular, finalmente en la tercer etapa fue evidente la pérdida de estructura celular en donde solo resta la degradación de los elementos mas complejos (lignina y celulosa) principalmente en paredes celulares secundarias.

CONTENIDO

	Páginas
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. ANTECEDENTES	12
2.1. Industria Tequilera.....	12
2.2. Anatomía del Agave	13
2.3. Vermicomposteo.....	16
2.3.1 Influencia de las Lombrices en el Suelo.....	17
2.3.2 Caracterización Microbiológica en Vermicompostas.....	19
2.4. Microscopía Electrónica de Barrido	21
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivo General.....	23
3.2. Objetivos Específicos	23
4. METODOLOGÍA	24
4.1. Vermicomposteo.....	24
4.2 Seguimiento del Proceso de Degradación por MEB	27
4.3 Estudio Microbiológico.....	29
4.4 Estudio Histológico. Descripción Anatómica de la piña de <i>Agave tequilana</i>	30

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
5.1 Vermicomposteo.....	32
5.2 Estudio Microbiológico	37
5.3 Estudio Histológico. Descripción Anatómica de la piña de <i>Agave tequilana</i>	38
5.4 Seguimiento del Proceso de Degradación por MEB, Análisis Histológico y Microbiológico de las fibras de <i>Agave tequilana</i>	42
6. CONCLUSIONES.....	46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXOS.....	53
Anexo A. Microbiología.....	53
Inóculos iniciales:.....	53
Inóculos Finales:.....	55
Anexo B. Microscopía Electrónica de Barrido.....	58
Tiempo 0. Inicio del Proceso de Degradación.....	58
Tiempo 1. Un mes de degradación	59
Tiempo 2. Dos meses de degradación	60
Tiempo 3. Tres meses de degradación	61

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.2	Proceso de Elaboración del Tequila, donde se ubica la generación de bagazo como residuo orgánico.....	12
2.4	Diagrama de flujo de la metodología para el vermicomposteo del bagazo de <i>Agave tequilana</i>	24
3.4	Gallinaza y Bagazo de Agave.....	25
4.4	Unidades experimentales de vermicomposteo en el invernadero del ITESM-CEM con un sistema electrónico de monitoreo de temperatura y humedad.....	26
5.4	Diagrama de flujo de la metodología para el seguimiento del proceso de degradación por microscopía electrónica de barrido (MEB).....	27
6.4	Imagen del Microscopio Electrónico de Barrido.....	28
7.4	Diagrama de flujo de la metodología para el estudio microbiológico de la vermicomposta de <i>Agave tequilana</i>	29
8.4	Diagrama de flujo de la metodología para el estudio histológico de la piña de <i>Agave tequilana</i>	30
9.4	Zonas de la piña de agave de donde se obtuvieron las muestras para su descripción anatómica.....	31
10.5	Porcentaje de COT (A) y Nitrógeno (B) en un tiempo cero y después de 1, 2 y 3 meses de degradación para las 4 muestras evaluadas.....	35
11.5	Relación C:N para cada una de las muestras, incluyendo al inicio del proceso los valores de bagazo fresco.....	36
12.5	Fotografía de MEB a 200x donde se muestra un haz vascular de la base de la hoja de <i>Agave tequilana</i> y las células que lo componen.....	38
13.5	Arreglo de los haces vasculares en la base de la hoja de <i>Agave tequilana</i> característico de monocotiledóneas.....	39

14.5	Arreglo del haz vascular sin casquete secundario de fibras. Se observan también algunos cristales de oxalato de calcio, células cribosas y elementos de vaso.....	40
15.5	Arreglo de los haces vasculares en un corte transversal de tallo de <i>Agave tequilana</i> que a diferencia de los haces vasculares de la región basal de la hoja no presentan un arreglo en una sola dirección.....	40
16.5	Haz vascular (500x) donde se observan células de diferente tamaño y engrosamiento de sus paredes celulares, se pueden apreciar también algunos cristales de oxalato de calcio en espacios intercelulares rodeando al haz (250x).....	43
17.5	Izquierda (100x), apariencia de las fibras de <i>Agave tequilana</i> cubiertas por cúmulos bacterianos y a la derecha (1,000x) la presencia de cúmulos bacterianos e hifas de microorganismos degradadores.....	43
18.5	Izquierda (450x), tubos cribosos con paredes celulares incompletas como resultado de la actividad microbiana. Derecha (100x), elementos que conforman a las fibras seccionados y dispersos y con acumulaciones de cristales de oxalato de calcio.....	44
19.5	Izquierda (500x) células de esclerénquima con paredes celulares gruesas y fuertemente lignificadas, rodeadas por evidentes cúmulos bacterianos, a la derecha a 1,000x se observan hifas de hongos.....	45

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.2	Principales microorganismos que intervienen en la degradación de residuos orgánicos y las estructuras que se degradan en diferentes fases.....	21
2.4	Distribución de las concentraciones de cada muestra a evaluar.....	25
3.5	Tolerancia de las lombrices <i>Eisenia foetida</i> a diferentes concentraciones de gallinaza.....	33
4.5	Porcentaje de N, P, K y COT en el producto final del vermicomposteo para los diferentes tratamientos aplicados.....	34

1. INTRODUCCIÓN

La industria tequilera ha adquirido gran importancia para México por su mercado Internacional al cual es destinado un 62.89% del total producido (CNIT, 2005) y gracias a la denominación de origen “Tequila” que se aplica únicamente a la bebida producida con agave azul de la especie *Agave tequilana* (SCFI, 1994). Su producción está limitada únicamente a algunos municipios de los estados de Guanajuato (seis municipios), Michoacán (treinta municipios), Nayarit (ocho municipios), Tamaulipas (once municipios) y a todo el estado de Jalisco (DOF, 1977). En este último se cultiva el 99.7% del total de agave azul producido para la industria, lo cual, para el estado en el año 2000, representó el 43 % de la superficie sembrada con cultivos industriales sólo superado por la siembra de caña de azúcar (SAGARPA, 2000).

Un problema de la industria tequilera es la generación de una gran cantidad de bagazo como residuo orgánico, resultante de la extracción del jugo de las piñas del agave. El cual no representa ninguna utilidad en la elaboración de Tequila. Una actividad que se ha adoptado para la disminución del impacto al ambiente por residuos orgánicos generados a nivel doméstico, comercial e industrial es la obtención de abonos orgánicos mediante el composteo de los mismos residuos. Sin embargo, la degradación de estos residuos por la actividad de lombrices de tierra con ayuda de otros microorganismos genera un producto llamado vermicomposta de mayor calidad, la cual, posee características fisicoquímicas y biológicas que aplicado como abono permite el mejoramiento en la calidad del crecimiento y desarrollo de los cultivos en general, de manera natural, sin causar daños en la estructura del suelo a diferencia de los fertilizantes químicos que llegan a provocar contaminación al ambiente, pérdida de suelos y daños a la salud de los consumidores de los productos cultivados.

Un proceso eficiente de degradación del bagazo generado en la industria tequilera tal como el vermicomposteo, permitiría su aprovechamiento en forma de abono orgánico en los principales cultivos del estado (agave azul, maíz, avena, frijol, trigo, durazno, chabacano, fresa, entre otros; INEGI, 2005). En el presente trabajo de investigación se pretendió

encontrar las concentraciones de bagazo combinado con gallinaza, generada en el mismo estado como residuo, que presenten una degradación eficiente en el menor tiempo mediante el proceso de vermicomposteo, así como hacer un seguimiento del proceso de degradación para una mejor elucidación y control microbiológico del proceso de degradación del bagazo como una propuesta de manejo sustentable de los recursos y desechos orgánicos de la industria tequilera, pudiéndose adaptar y aplicar a las condiciones, residuos y cultivos de otros estados del país.

2. ANTECEDENTES

2.1. Industria Tequilera.

El bagazo de agave es la fibra residual que queda después de que las cabezas de agave o piñas son cocidas, desgarradas, molidas y lavadas para la extracción de los azúcares utilizados en la elaboración del Tequila (Iñiguez-Covarrubias *et. al.*, 2001^a; Fig. 1.1). El bagazo representa el 40 % del peso total de la piña en base húmeda, con una composición de 43 % de celulosa, 19 % de hemicelulosa, 15 % de lignina, 3 % de nitrógeno total, 1 % de pectina, 10 % de azúcares residuales y 9% de otras sustancias. Esto es, por cada litro de tequila que se produce, se generan aproximadamente entre 55 y 60 kg de bagazo del *Agave tequilana* (Ilangovan, 1996). Si se toma en cuenta que durante el 2005 hasta el mes de septiembre, se tuvo una producción de 1.6×10^8 litros de tequila referidos a 40% alc/vol (CNIT, 2005), se puede hacer una estimación de la cantidad de bagazo generado como residuo orgánico ($\approx 2.1 \times 10^8$ Ton/ año).

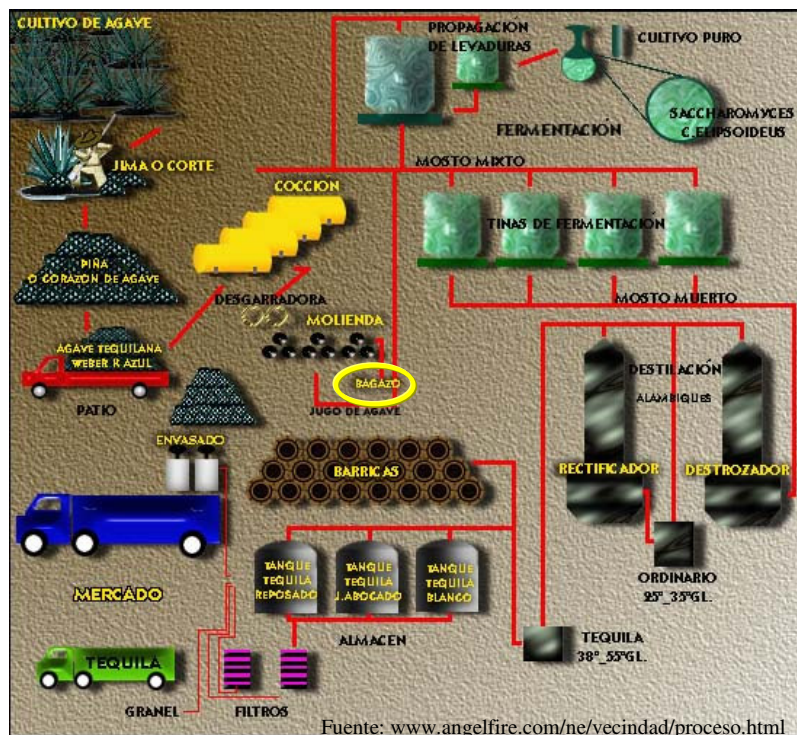


Fig. 1.2 Proceso de Elaboración del Tequila, donde se ubica la generación de bagazo como residuo después de las etapas de cocción, desgarramiento y molienda.

Al bagazo generado como residuo orgánico en la industria tequilera se le ha dado diferentes usos. La Universidad de Guadalajara, México (Casillas, 1996) realizó una investigación sobre el aprovechamiento del bagazo de agave, en la cual divide al residuo en carnosidad y fibra, la primera es utilizada como alimento para el ganado y la segunda para el relleno de colchones, siendo las únicas vías comerciales. Se menciona también que el bagazo en ocasiones es utilizado para cubrir basura en rellenos sanitarios. Otra aplicación es la elaboración de ladrillos en combinación con arcilla y como sustrato en la producción de hongos comestibles (Ilangovan, 1996). Iñiguez-Cobarrubias *et. al.* (2001a), demostraron la efectividad del bagazo en la fabricación de láminas de las fibras conglomeradas. Por su parte, Idarraga *et. al.* (1999) realizaron pruebas con este residuo para la fabricación de papel de calidad media utilizado para publicaciones.

En cuanto a su utilización con técnicas de composteo se ha investigado la efectividad del mezclado por capas de intestino grueso de cerdos con bagazo de agave húmedo (Iñiguez-Cobarrubias y Vaca, 2001b). Así mismo, dos empresas tequileras: Tequila Jalisco y Herradura, están transformando el bagazo de su industria, mediante la utilización de lombriz de tierra, con lo que solucionan el problema de sus desechos y generan un abono que enriquece las tierras de cultivo del agave (López, 2000).

2.2. Anatomía del Agave

Los órganos de las plantas están constituidos por tejidos que a su vez, están formados por gran cantidad de células con funciones y estructuras diferentes. Gracias a la anatomía vegetal como ciencia que describe diferentes órganos y tejidos de plantas, se ha llegado a entender la disposición de los diferentes elementos que las conforman, mecanismos de adaptación, procesos fisiológicos, alteraciones estructurales, procesos ontogénicos, entre otros.

Para el caso específico de *Agave tequilana* en la producción de tequila, los elementos que constituyen la piña utilizada en este proceso son la región basal de las hojas y el tallo. Entre

algunas descripciones de estas regiones de la planta en especies pertenecientes al mismo género destacan los siguientes tipos celulares y estructuras principalmente:

Epidermis, es la capa celular más externa de los órganos de las plantas expuesta al medio atmosférico. La pared de las células epidérmicas se presenta engrosada y compuesta principalmente de celulosa. En la pared superficial de la célula se intercala una sustancia lipídica llamada cutina, que se expulsa y forma una capa denominada cutícula. A lo largo de la capa de células epidérmicas se llegan a encontrar pequeños espacios conformados por células especializadas que en conjunto se denominan estomas, los cuales, regulan el intercambio de gases con el medio externo así como la expulsión de vapor de agua o transpiración.

Parénquima, son células de forma poliédrica y vivas, no totalmente especializadas que juegan un papel importante en la regeneración de tejidos, fotosíntesis, reservorio de alimentos y almacenamiento de agua. Formadas por una pared primaria delgada con punteaduras simples en las zonas correspondientes a los plasmodesmos. En esta pared se acumula hemicelulosa y es frecuente que presenten paredes secundarias lignificadas y relativamente gruesas cuando están asociadas a xilema secundario.

Esclerénquima, son células que al madurar ya no están vivas, su función es de soporte de órganos maduros, ofreciendo resistencia a la compresión y al esfuerzo. Tienen paredes celulósicas gruesas y lignificadas, lo cual proporciona rigidez al órgano. Se pueden diferenciar dos tipos de esclerénquima: 1) fibras, células alargadas, afiladas en sus extremos y de longitud variable, se encuentran con frecuencia entre los tejidos vasculares. Es importante resaltar que el término fibra desde el punto de vista botánico es diferente al comercial, pues en este caso se trata de los haces vasculares junto con la vaina de fibras que los rodean, mientras que el término fibra desde el punto de vista botánico se refiere a una célula con las características ya descritas anteriormente; 2) esclereidas, son cortas y anchas, no tienen sus extremos afilados y por lo general aparecen como masas celulares duras dentro de tejidos blandos parenquimáticos.

Xilema, su función principal es el transporte de agua y solutos. Está constituido por fibras, parénquima y células conductoras denominadas elementos de vaso y traqueidas que son células muertas, sin protoplasto y con paredes primarias y secundarias lignificadas. Los elementos de vaso o traqueales se diferencian por la forma y la estructura de su pared secundaria que varía dependiendo de la elongación que vaya presentando, tomando diferentes formas entre las que se distinguen engrosamientos anulares o helicoidales y escalariformes en el caso de un periodo de mayor elongación; y reticular o con punteaduras aeroladas cuando la elongación es menor. Todos estos engrosamientos pueden encontrarse en una misma planta. Los elementos de vaso en sus extremos están completamente perforados, en longitud suelen ser más cortos que las traqueidas y se organizan en filas verticales, una hilera de elementos traqueales se denomina vaso o tráquea.

Las traqueidas son células conductoras alargadas, más sencillas que los elementos de vaso, cortas y ligadas a una mayor eficiencia de la conducción. En sus paredes engrosadas hay zonas delgadas o punteaduras a través de las cuales el agua puede pasar fácilmente.

El **Floema** por su parte, está formado por elementos cribosos, células acompañantes, fibras y parénquima. Las células cribosas tienen la función de conducir los productos de la fotosíntesis en la planta (fotosintetatos), estas células presentan sólo paredes primarias constituidas principalmente por celulosa y están vivas aunque generalmente carecen de un núcleo.

Cristales, son productos finales de los procesos metabólicos celulares. Los más comunes son los de sales de calcio, principalmente de oxalato cálcico. En agave se han descrito cristales prismáticos alargados y también cristales delgados formando haces que se denominan rafidios y que se encuentran en espacios intercelulares o en células llamadas idioblastos (Tejero y Granillo, 1998; Fahn, 1982; Blunden y Yi Yi, 1973).

2.3. Vermicomposteo

La Vermicomposta es el producto de la digestión de las lombrices de tierra generado a partir de la biodegradación y estabilización de los compuestos orgánicos, mediante interacciones entre lombrices de tierra y microorganismos (Santamaría-Romero *et al.* 2001).

A diferencia del proceso de composteo común, en el vermicomposteo las lombrices aceleran la descomposición de los residuos orgánicos, como son: residuos orgánicos municipales y de hortalizas (Singh y Sharma, 2003, Santamaría-Romero *et al.*, 2001), estiércol de cerdo (Cavender *et al.*, 2003), estiércol de ganado (Hamman *et al.*, 2003), gallinaza (Ramachandran y Subramanian, 2004; Borazjani, *et al.*, 2004), estiércol de conejo (Santamaría-Romero *et al.*, 2001), entre otros; además de mejorar la calidad de la composta, reflejada en la respuesta de los cultivos a su aplicación (Singh y Sharma, 2003), la cual suele ser superior a la de la composta convencional (Santamaría-Romero *et al.*, 2001). Trabajos realizados sobre vermicomposteo demuestran que las lombrices se alimentan de una cantidad equivalente a su propio peso y únicamente aprovechan en sus procesos internos un 40% del total, el resto (60%) lo expulsan en forma de humus representando un proceso eficiente en la producción de abono orgánico (Ferruzzi, 2001).

En cuanto a beneficios a la salud de los cultivos, se ha demostrado que la vermicomposta puede suprimir las enfermedades de las plantas por *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Verticillium* (Chaoui *et al.*, 2002) y nemátodos parásitos (Arancon *et al.* 2003). Por otra parte, la vermicomposta inoculada con *P. sajor-caju*, *T. harzaianum* y *A. chroococcum* no presentó cambios significativos en las condiciones químicas de la composta, sin embargo mejoró las propiedades de crecimiento de las plantas (Singh y Sharma, 2003).

Para la producción de vermicomposta, Ferruzzi (2001), no aconseja los estiércoles procedentes de explotaciones intensivas de pollos, gallinas, pavos y aves en general, debido a su fuerte acidez y el prolongado espacio de tiempo necesario (14 – 16 meses) para que la fermentación concluya y alcance un valor de pH 7.0. Sin embargo estos estiércoles, se han

utilizado en combinación con otros desechos orgánicos para la producción de composta, obteniendo resultados en 90 días en combinación con los residuos de madera provenientes de un aserradero y probando concentraciones en incremento de estiércol de pollos (Borazjani *et al.*, 2004). Además, se desarrolló un fertilizante a base de desechos de coco, piedras de fosfato, inóculos de microbios y estiércol de pollos disminuyendo el tiempo de obtención de la composta a 60 días (Ramachandran y Subramanian, 2004). Por su parte, Cavender *et al.* (2003) aplicaron la técnica de vermicomposteo a estiércol de cerdos y evaluaron la influencia del producto en la colonización por micorrizas.

2.3.1 Influencia de las Lombrices en el Suelo

Se ha demostrado que las lombrices afectan significativamente las propiedades y procesos claves del suelo tales como: biomasa, actividad microbiana, dinámica de la materia orgánica, disponibilidad de nutrientes, asimilación de nutrientes, reproducción de plantas y estructura de suelo (Edwards, 2004). Si tomamos en cuenta que, de estos elementos depende en gran medida la calidad de un fertilizante entonces podremos entender la importancia y el papel de las lombrices en el suelo.

Se ha visto que las lombrices se alimentan selectivamente en zonas con mayor cantidad de materia orgánica (Lee, 1985; Mulongoy y Berodet, 1989; Judas, 1992; Zhang y Schraeder, 1993; Doube *et al.* 1994) dando lugar a una selección del alimento, sin embargo, muchas lombrices poseen una mínima capacidad de digerir residuos orgánicos por lo que se nutren a través de la digestión de microorganismos que están asociados con la materia orgánica ingerida (Edwards y Fletcher, 1988; Brown, 1995; Lavelle *et al.*, 1994). Una vez ingerida esta materia orgánica en su paso por el tracto digestivo se lleva a cabo una mezcla orgánica y mineral (nutrientes del suelo) y una selección de microorganismos al llegar al intestino, donde son secretadas varias enzimas de origen microbiano y de las mismas lombrices, así como el mucus intestinal (una fuente disponible de carbono asimilable) y sustancias bacteriostáticas y microbicidas incluyendo antibióticos de origen microbiano y bacteriolisinas, peroxidasas y fagocitosas originadas en las lombrices. Todo esto tiene

influencia en la habilidad de un microorganismo que es ingerido para sobrevivir en su paso a través del intestino (Brown, 1995). Los sobrevivientes (principalmente hongos y bacterias resistentes) proveen el inóculo para la colonización de los desechos de las lombrices (Dash, *et al.*, 1986; Spiers, *et al.*, 1986; Brown, 1995).

Los desechos de las lombrices son micrositios ricos en carbono y nitrógeno disponibles (Svensson *et al.*, 1986). Elliot *et al.*, (1990, 1991) compararon las tasas de desnitrificación en los desechos de las lombrices y en el suelo y encontraron tasas mas altas en los primeros. Mientras la desnitrificación de los desechos de las lombrices contribuye a la pérdida de nitrógeno del sistema, la común formación de agregados estables de estos desechos lleva a una protección del carbono y nitrógeno a largo plazo. La fuente de nitrógeno es principalmente la orina (amonio y urea) y la de carbono asimilable son el mucus secretado por las lombrices (mucoproteínas) (Scheu, 1991) además del carbono disuelto mediante la descomposición de la materia orgánica en componentes de menor tamaño y solubles en agua (Wen, B. *et al.*, 2004), estos elementos disponibles junto con la selección de microorganismos en el intestino de las lombrices permiten simultáneamente: un decremento en la biomasa microbiana y un incremento en la respiración microbiana en desechos orgánicos con actividad de lombrices (Scheu, 1987; Wolters y Jorengsen, 1992). El incremento simultáneo en la respiración y disminución en la biomasa sugiere que el suelo afectado por las lombrices pudiera contener una comunidad microbiana pequeña pero metabólicamente más activa que el suelo sin lombrices (Parmelee *et al.*, 1998).

Por otra parte, las lombrices durante su desplazamiento van formando macroporos con paredes ligeramente compactas cubiertas con algunas capas de mucopolisacáridos (Kretzschmar, 1998) mejorando la transferencia de masa en el suelo. Estos tienen influencia sobre la distribución espacial de los microorganismos debida parcialmente a la fuente de carbono orgánico transferido a través del sistema de cavidades (transporte mecánico de elementos orgánicos de la superficie, depósitos de mucus en las paredes de las cavidades, cavidades rellenas de desechos de lombrices) y a la transferencia de los microorganismos que sobreviven al tránsito por el intestino de las lombrices y/ o por su dispersión mediante el paso del agua a través de las cavidades (Edwards, 2004).

Las condiciones ambientales y nutrimentales del suelo, influyen directamente en la presencia/ ausencia de las lombrices en el mismo. Y una vez presentes, las mismas lombrices llegan a tener influencia en los valores de pH y temperatura. Para el caso de la especie utilizada en el presente trabajo de investigación, *Eisenia foetida*, el pH óptimo está dentro de valores neutros a ligeramente alcalinos, la actividad de las lombrices incrementa su valor en el suelo debido a la excreción de componentes de calcio por medio de glándulas calcíferas (Hu *et. al.*, 1998), sin embargo también se ha señalado que las lombrices aún no teniendo dichas glándulas incrementan el pH debido a su orina alcalina (Wen, B. *et. al.*, 2004). Por otra parte, la temperatura y la humedad también son factores importantes para el desarrollo de las lombrices, pues proliferan entre 13 y 17° C aunque prosperan mejor entre 22 y 24° C, temperaturas en las que también se desarrollan muchas especies de hongos, bacterias y actinomicetos, además se requiere de una humedad entre 70 y 85% (Santamaría-Romero *et. al.* 2001; Ferruzi, 2001; Alexander, 1980).

2.3.2 Caracterización Microbiológica en Vermicompostas

En base a que la velocidad del proceso de vermicomposteo podría acelerarse si se conociera la cinética de las poblaciones participantes y los factores que la influyen ya que, de esta manera, se podrían manipular las etapas de degradación mediante el control de la presencia/ausencia de los microorganismos necesarios para dicho fin, Corlay *et al.* (1999) realizaron un estudio sobre la cinética de las comunidades microbianas, mediante la cuantificación del número de bacterias, actinomicetos y hongos presentes en el proceso de producción de composta y vermicomposta en tres sustratos: paja de avena, estiércol bovino y desechos hortofrutícolas. Sin embargo, no pudieron definir un esquema único de sucesión microbiana. Por su parte, Rodríguez-Macías *et al.* (2004) realizaron un estudio en el cual determinaron la dinámica y cuantificación de los mismos grupos microbianos durante el proceso de vermicomposteo de bagazo de agave tequilero *Agave tequilana* basados en la afirmación de que la participación de las lombrices en la biotransformación de la materia orgánica está en estrecha relación con los grupos microbianos presentes en los residuos. En

general, en estos trabajos de investigación se ha descrito que las poblaciones microbianas decrecen al transcurrir el tiempo de biodegradación por vermicomposteo, lo cual se atribuye al agotamiento de compuestos carbonados de fácil descomposición (Rodríguez-Macías *et al.*, 2004; Madigan *et al.* 1999; Corlay *et al.*, 1999; Paul y Clark, 1996), estos son los que se fraccionan inicialmente y sirven de sustrato para una gran diversidad de microorganismos por lo que se incrementa la biomasa en las etapas iniciales del proceso, mientras que en etapas posteriores, los materiales restantes son mas complejos (celulosas y hemicelulosas) y los microorganismos que los atacan son específicos y menos abundantes (Alexander, 1980).

Los principales responsables de la degradación de celulosa son los hongos, por esta razón, el decremento de estos organismos se da conforme avanza el proceso de degradación de los residuos orgánicos hasta etapas finales, sus unidades formadores de colonias (ufc) llegan a ser inferiores a las de bacterias, no obstante que la biomasa total se obtiene principalmente de los hongos (Rodríguez-Macías, 1993). En cuanto a degradación de lignina, los hongos también presentan mayor actividad ligninolítica en comparación con el resto de los microorganismos que se desarrollan en el proceso (Alexander, 1980). Las fases de degradación, algunos de los microorganismos que intervienen en la degradación de residuos orgánicos y las estructuras que se degradan han sido descritas por varios autores y se resumen en la tabla 1.2.

Tabla 1.2 Principales microorganismos que intervienen en la degradación de residuos orgánicos y las estructuras que se degradan en diferentes fases.

Fases de descomposición	Especies microbianas		Elementos aprovechados/ degradados
	Hongos	Bacterias	
1	<i>Mucor sp</i> , <i>Pythium sp</i> y <i>Penicillium sp</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	Carbohidratos, ácidos orgánicos, aminoácidos (Harper y Lynch, 1985; Bowen y Harper, 1989; Moody, 1993 y 1995)
2	<i>Trichoderma sp</i> , <i>Fusarium sp</i> y <i>Chaetomium sp</i>	<i>Bacillus sp</i>	Celulosa y hemicelulosa (Garnett, 1981 y Moody, 1993)
3	<i>Basidiomicetos sp</i> , <i>Fusarium sp</i> y <i>Trichoderma sp</i>		Lignina (Bowen, 1990; Bowen y Harper, 1990; Moody, 1993)

2.4. Microscopía Electrónica de Barrido

El uso de Microscopía electrónica de barrido se ha extendido ampliamente teniendo numerosas aplicaciones en diferentes campos científicos incluyendo las áreas de ciencias biológicas, ambientales, de materiales entre otras. Esta técnica consiste, principalmente, en proporcionar imágenes y datos físico-químicos de la superficie de una muestra mediante un haz de electrones muy delgado y detectores que transducen las señales que emanan de la superficie. El haz de electrones recorre toda la muestra realizando un barrido en las direcciones “X” y “Y” de tal modo que la posición en la que se encuentra el haz en cada momento coincide con la aparición de brillo, proporcionalmente a la señal emitida, en un determinado punto de una pantalla, es decir, las señales son transformadas en corrientes eléctricas que se emplean en formar una imagen en un monitor. Las imágenes que se

obtienen en el microscopio electrónico de barrido corresponden a electrones secundarios y electrones retrodispersados emitidos tras la interacción con la muestra de un haz incidente. La señal de los electrones secundarios se forma en una delgada capa superficial, del orden de 50 a 100 Å. Al ser grande el número de electrones emitido se puede establecer un buen contraste. Por otra parte, al ser electrones de baja energía, menos de 50 eV, pueden ser desviados fácilmente de su trayectoria emergente inicial, y se puede obtener información de zonas que no están a la vista del detector. Esta particularidad es fundamental para otorgar a esta señal la posibilidad de aportar información “en relieve”, proporcionando una imagen de mayor resolución que la suministrada por otros detectores. Los electrones secundarios emitidos por la muestra son los que se utilizan más comúnmente para los estudios morfológicos de los especímenes biológicos. Por esta razón los detectores de electrones secundarios forman parte de los equipos básicos de todos los microscopios electrónicos de barrido. Por otra parte, la principal utilidad de los electrones retrodispersados reside en que su emisión, que se debe a choques de tipo elástico y por tanto con energía del mismo orden que la de los electrones incidentes, depende fuertemente del número atómico de la muestra. Esto implica que dos partes de la muestra que tengan distinta composición se revelan con distinta intensidad aunque no exista ninguna diferencia de topografía entre ellas. Por lo tanto los electrones retrodispersos pueden servir por un lado para dar imágenes de superficies, en lo que son menos eficientes que los secundarios, y por otro, para informar sobre la composición atómica de la región adyacente a la superficie (Vázquez y Echeverría, 2000; ASM, 1992).

A la fecha, no se encontraron estudios a nivel Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) que relacionen el ecosistema en el cual tienen influencia las lombrices en un sistema de vermicomposteo, con el proceso de degradación de materia orgánica, integrando los datos microbiológicos hasta ahora generados en los diferentes estudios.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Establecer parámetros de control y seguimiento del proceso de vermicomposteo del bagazo de *Agave tequilana*, utilizando como herramienta la técnica de microscopía electrónica de barrido, como contribución al mejoramiento de la degradación del bagazo generado como residuo orgánico en la Industria Tequilera.

3.2. Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de la gallinaza y tierra negra aplicados en diferentes concentraciones a un proceso de vermicomposteo de bagazo de *Agave tequilana*.
- Evaluar la dinámica del proceso de degradación relacionada directamente con la actividad de los microorganismos
- Establecer el seguimiento del proceso de degradación del bagazo por vermicomposteo a través de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).
- Establecer la histología de la piña de *Agave tequilana* para facilitar la identificación de estructuras en el proceso de degradación.

4. METODOLOGÍA

4.1. Vermicomposteo

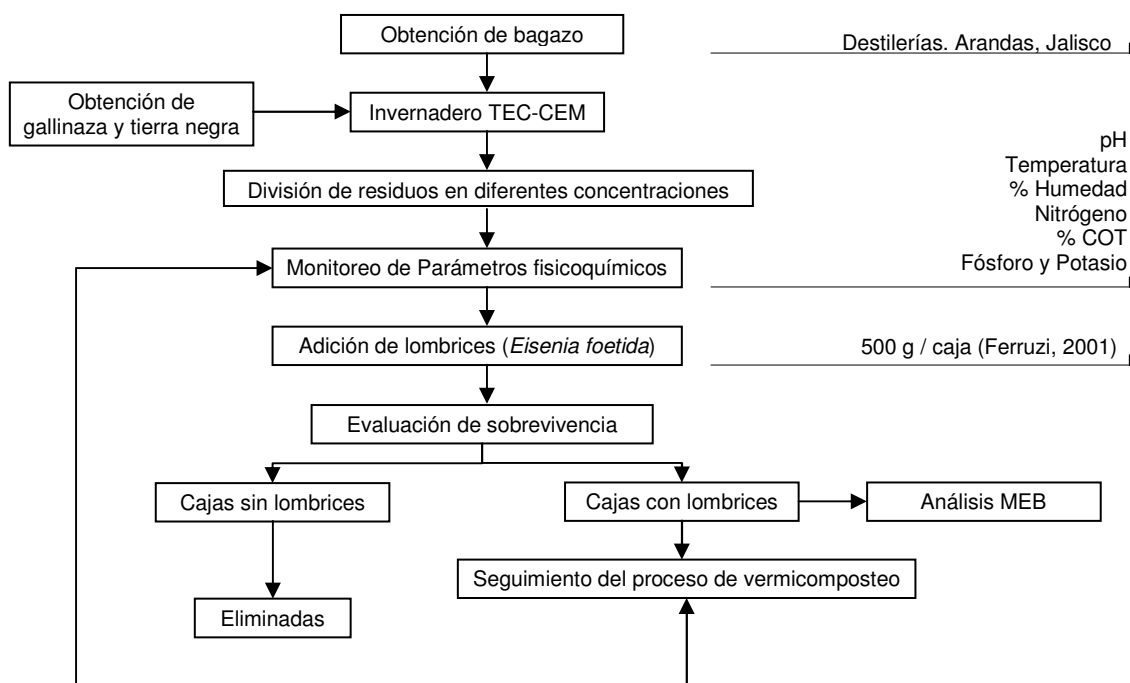


Figura. 2.4 Diagrama de flujo de la metodología para el vermicomposteo del bagazo de *Agave tequilana*.

Se obtuvieron residuos orgánicos de la industria tequilera (bagazo) provenientes de las destilerías “Tequila Espolón” y “Tequila Campanario” ubicadas en el poblado de Arandas, estado de Jalisco, dichos residuos fueron trasladados a un sitio destinado para el presente proyecto en el invernadero del ITESM Campus Estado de México. Por otra parte se obtuvieron los residuos orgánicos (gallinaza) (Fig. 3.4) generados en una granja avícola, tierra negra y una cepa de lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) en Texcoco, Estado de México.

Las fibras de bagazo se separaron manualmente de tal manera que no quedaran los residuos compactos y así facilitar su proceso de descomposición. A la gallinaza y la tierra negra no

se les dio tratamiento previo a su utilización. El bagazo (Bg) junto con la gallinaza (Ga) y la tierra negra (Tn) se dividieron en 9 tinas de plástico (unidades experimentales) con medidas de 100 x 51 x 18 cm (fig. 4.4) que sirvieron como lecho. Cada unidad experimental correspondió a diferentes concentraciones de Bg, Ga y Tn de acuerdo a la tabla 2.4.



Figura. 3.4 A. Gallinaza obtenida en una granja avícola y B. Bagazo de Agave Tequilero (*Agave tequilana*) proveniente de una destilería de Arandas, Jalisco.

Tabla 2.4. Distribución de las concentraciones de cada muestra a evaluar

PORCENTAJE DE CONCENTRACIÓN DE CADA MUESTRA DONDE: x =Bagazo y = Gallinaza z = Tierra Negra (humus)	DISTRIBUCIÓN DE LAS MUESTRAS								
	1			2			3		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
	x=60	x=60	x=60	x=70	x=70	x=70	x=80	x=80	x=80
	y=40	y=30	y=0	y=30	y=20	y=0	y=20	y=10	y=0
	z=0	z=10	z=40	z=0	z=10	z=30	z=0	z=10	z=20

Una vez distribuidos los residuos orgánicos en las concentraciones correspondientes se añadieron 500g de lombrices (adultas, juveniles y algunos cocones mezclados) a cada unidad experimental tomando como referencia que por cada metro cuadrado se debe añadir

1 kg de lombrices (Ferruzzi, 2001). Después de 24 horas, se separaron manualmente las lombrices vivas de cada tina para registrar el peso y evaluar su sobrevivencia en términos de biomasa.



Figura. 4.4. Unidades experimentales de vermicomposteo en el invernadero del ITESM – CEM con sistema electrónico de monitoreo de temperatura y humedad.

Desde la adición de las lombrices a cada tina o unidad experimental se registró el pH, preparando muestras con una relación sustrato:agua de 1:1 (v:v), se agitaron intermitentemente durante 30 minutos, posteriormente se dejaron en reposo por otros 30 minutos y finalmente se tomó la lectura de un potenciómetro con electrodo (Rodríguez, 2002); la temperatura se registró con un termómetro de mercurio diariamente entre las 15:00 y 16:00 horas y el porcentaje de Humedad se calculó por el método gravimétrico, el cual consistió en pesar un crisol por cada unidad experimental y por triplicado, posteriormente se volvía a pesar con 1g del sustrato correspondiente y se llevaba a la estufa a una temperatura de 110°C durante 36 horas. Pasado este tiempo, se dejaba enfriar y se pesaba, si el peso no era constante se dejaba de nuevo en la estufa por dos horas más hasta obtenerlo. Finalmente se obtenía el porcentaje de humedad de acuerdo a la siguiente fórmula: $\%H = \frac{\text{masa de suelo húmedo} - \text{masa de suelo seco}}{\text{masa de suelo seco}} \cdot 100$

(Rodríguez, 2002). Como control para las mediciones de temperatura y humedad adicionalmente se contó con un sistema electrónico de monitoreo de estos parámetros (Fig.4.4). Para la obtención de los valores de porcentaje de nitrógeno (%N), fósforo (%P), potasio (%K) y carbono orgánico total (%COT) mensualmente, se tomaron muestras de 3g de sustrato por cada unidad experimental, las cuales fueron analizadas por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMyT), en Texcoco, Estado de México, bajo la metodología del Soil Science Society of America (2002). El nitrógeno y carbono orgánico total se consideraron como parámetros indicadores de la actividad microbiológica y junto con los demás nutrientes (P y K) sirvieron para evaluar la calidad final de la vermicomposta obtenida como abono orgánico.

4.2 Seguimiento del Proceso de Degradación por MEB

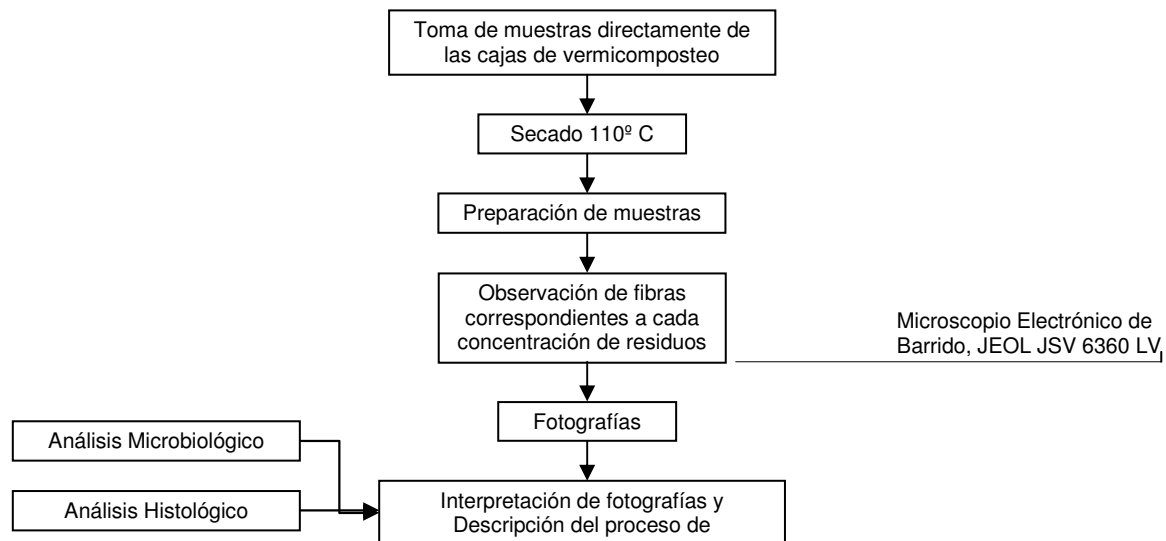


Figura. 5.4 Diagrama de flujo de la metodología para el seguimiento del proceso de degradación por microscopía electrónica de barrido (MEB).

De cada unidad experimental de vermicomposteo se llevó a cabo el seguimiento del proceso de degradación por la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). El

equipo utilizado fue el modelo JEOL JSV 6360 LV del Laboratorio de Materiales del Campus (Fig. 6.4).

Mensualmente se tomaron muestras de cada unidad experimental, para poder ser observadas en el MEB se secaban a 110°C durante 24 horas con la finalidad de eliminar toda el agua contenida y poder apreciar la morfología de las fibras, posteriormente de cada una se tomaron submuestras al azar que fueron montadas en cinta de carbono para lograr una mejor conductividad.

En la observación de las muestras se utilizó la técnica de bajo vacío con una presión de 40Pa, la técnica de visualización fue por electrones secundarios. Se realizaba una revisión o barrido por toda la muestra y de todos los campos visuales que se observaban diferentes se tomaron fotografías con la finalidad de llevar un registro de los cambios dados durante el proceso de degradación para su posterior identificación y así contribuir en la descripción del contenido microbiológico.



Fig. 6.4 Microscopio Electrónico de Barrido del laboratorio de materiales del ITESM-CEM.

4.3 Estudio Microbiológico.

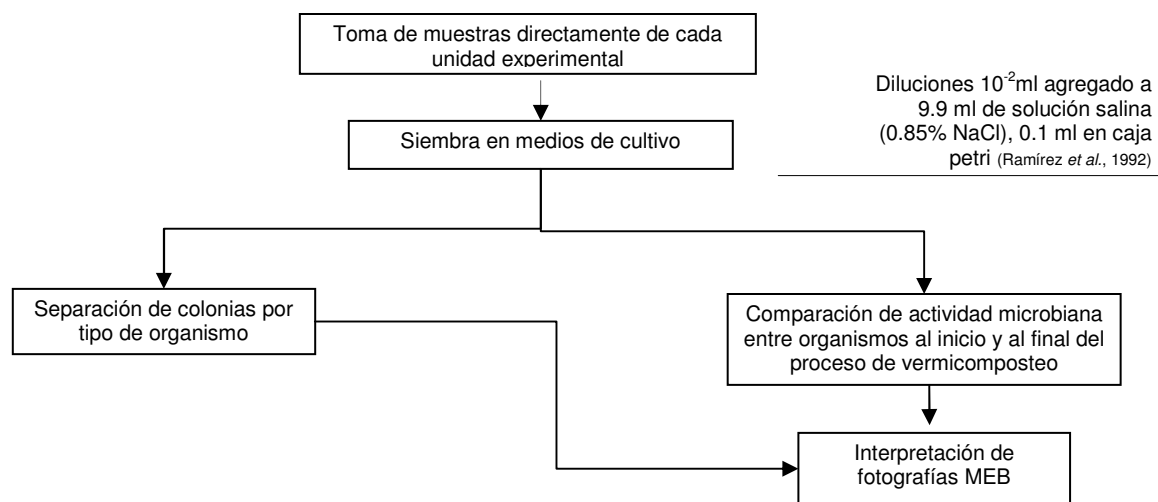


Figura. 7.4. Diagrama de flujo de la metodología para el estudio microbiológico de la vermicomposta de *Agave tequilana*.

Al inicio y al final del proceso de vermicomposteo, para cada unidad experimental se tomaron 5 muestras al azar que fueron mezcladas para formar una muestra compuesta. De cada mezcla se hizo una dilución de 10^{-2} ml que fue agregado a 9.9 ml de solución salina (0.85% NaCl; Ramírez *et al.*, 1992), se tomó 0.1 ml de solución y se vació en una caja petri. Todas las cajas se incubaron a 35 °C durante 24 horas.

Las siembras se realizaron por triplicado para cada unidad experimental y para cada medio de cultivo: CASO (Agar – peptona de caseína-peptona de harina de soja), utilizado para el cultivo de bacterias del suelo (Lorch *et al.*, 1995; Madigan *et al.*, 1999); SABOURAUD (Agar-maltosa 4%) comúnmente utilizado para cultivo de hongos pero ajustando el pH a 7 con NaOH crecen actinomicetos; y PDA (Agar-patata-glucosa) selectivo para hongos (Ramírez *et al.* 1992).

De cada caja petri se separaron las diferentes colonias en nuevas cajas. Se comparó el crecimiento de cada grupo microbiano (bacterias, hongos y actinomicetos) en las cajas de los inóculos al inicio del proceso de vermicomposteo con los del final del proceso, registrando las diferencias en actividad microbiana. Esto con la finalidad de relacionar los datos de actividad microbiana con el proceso de degradación en las observaciones por MEB.

4.4 Estudio Histológico. Descripción Anatómica de la piña de *Agave tequilana*

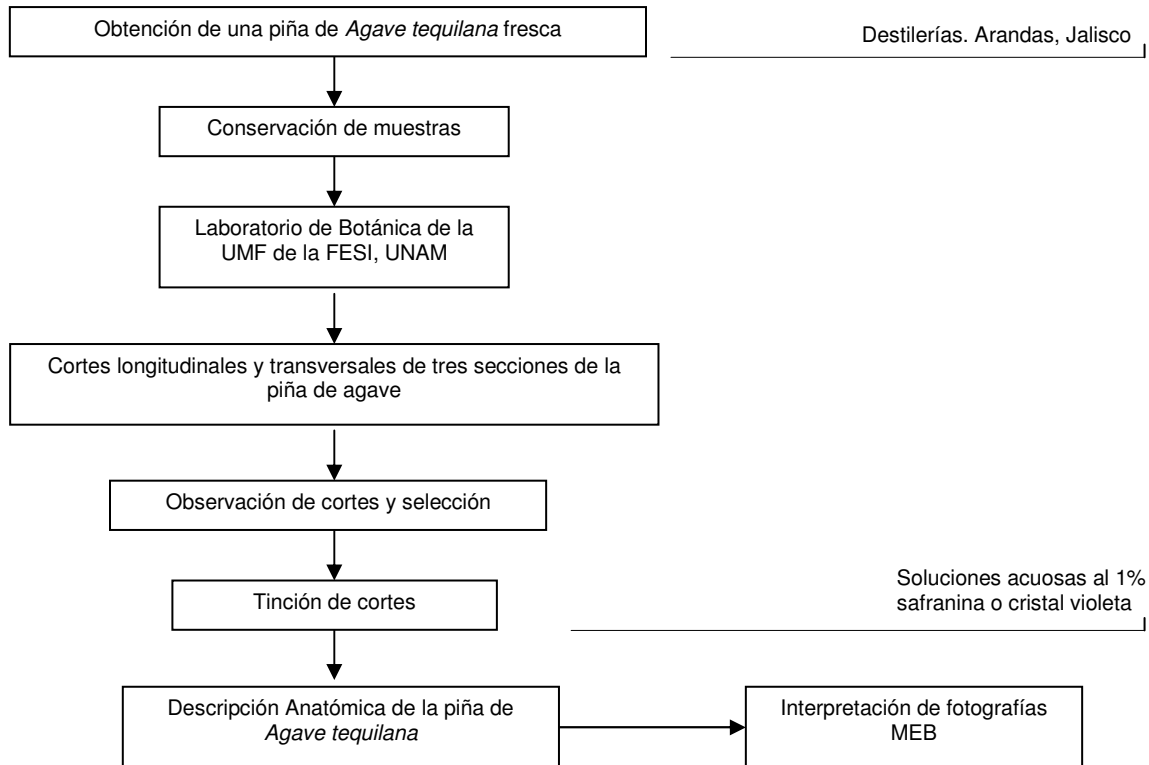


Figura. 8.4. Diagrama de flujo de la metodología para el estudio histológico de la piña de *Agave tequilana*

El estudio histológico se realizó en el tallo o piña de *Agave tequilana* (Weber) obtenido después del proceso de Jima o corte de hojas, previo a la elaboración del tequila en la destilería Campanario en Arandas, Jalisco.

Se obtuvieron muestras de aproximadamente 5 cm³ de la región basal de la hoja (M1) y del tallo (M2 y M3) con la finalidad de identificar los elementos que constituyen la piña y su disposición en la misma (Fig. 9.4). Estas fueron preservadas en alcohol al 70% y trasladadas al laboratorio de Botánica de la Unidad de Morfofisiología y Función en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se realizó un examen al estado fresco para identificar las diferentes formas que presentan las células en los tejidos y las variaciones que sufren en forma y disposición en

tejidos contiguos, pudiéndose observar la estructura natural de las células vegetales sin ninguna modificación o alteración.

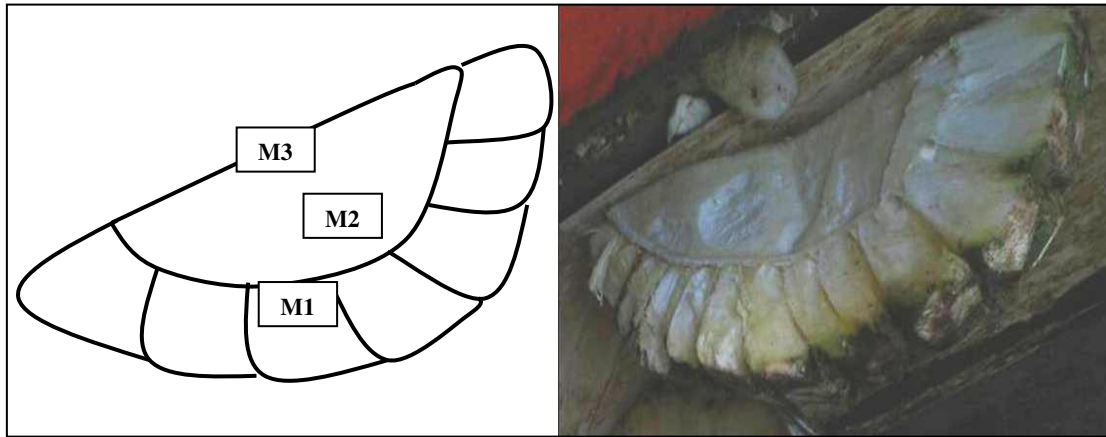


Figura. 9.4 Piña de *Agave tequilana* de donde se tomaron las muestras en tres zonas diferentes. La muestra externa (M1) correspondió a la parte basal de las hojas y las otras dos muestras (M2 y M3) al tallo.

De cada muestra se realizaron cortes transversales y longitudinales a mano alzada empleando una navaja de rasurar. Los cortes se dejaron caer en una caja petri con agua y las más delgadas se colocaron en portaobjetos para ser observadas en microscopio óptico. Para las observaciones por MEB los cortes se colocaron directamente en cinta de carbono sobre la platina.

Para detectar paredes lignificadas de células xilemáticas conductoras y esclerenquimáticas, los cortes que se observaron en microscopio óptico se tiñeron empleando soluciones acuosas de Safranina o Cristal violeta al 1%. Estos colorantes permitieron diferenciar claramente las partes lignificadas de las celulósicas. Después de cinco minutos los tejidos se lavaron con agua corriente y finalmente se montaron en gelatina glicerinada. Este es un medio de montaje semipermanente que permite una ligera fijación del cubreobjetos y el tejido al portaobjetos al mismo tiempo que solidifica rápidamente (Aguilar-Rodríguez, 1998).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Vermicomposteo.

Durante el proceso de vermicomposteo la temperatura en cada caja o unidad experimental fluctuó entre los 18.60 – 26.79° C, siendo los 23°C la temperatura promedio a lo largo de cada día durante los tres meses, valor que está dentro del rango óptimo (22 - 24°C) para la actividad de las lombrices. La humedad del material se controló entre valores de 60 y 85% a través de riego manual. Cabe mencionar que el sistema electrónico de monitoreo por medio de sensores de temperatura y humedad instalados directamente en las cajas de los tratamientos resultó una herramienta útil en el control de estos parámetros, sin embargo aún falta por considerar la fuente de energía debido a fallas en el suministro de electricidad que llegan a interrumpir la captura constante de datos.

En cuanto al pH, el bagazo obtenido de las destilerías presentó valores de 4, al ser combinado con tierra aumentó a 6 y con todas las mezclas en diferentes proporciones de gallinaza y tierra, o solo con gallinaza a 7 en el tiempo cero. Después de 3 meses el pH de todas las concentraciones fue de 8, valor que está dentro del intervalo reportado para vermicompostas compuestas de diferentes residuos y que permite una mejor descomposición de la materia orgánica facilitando la degradación de la celulosa (Santamaría-Romero *et al.*, 2001; Alexander, 1980).

La sobrevivencia de las lombrices en las unidades experimentales que no contenían gallinaza fue de 100% y en presencia de gallinaza las lombrices solamente toleraron una concentración de 10% o menor (tabla 3.5). El peso de biomasa de lombrices se mantuvo constante en las concentraciones 1C= 60:40:0; 2C= 70:30:0; 3C= 80:20:0; y 3B= 80:10:10 (bagazo:tierra:gallinaza) y bagazo. El contenido de las cajas con un porcentaje mayor al 10% de gallinaza se compactó y presentó un olor desagradable, a diferencia del resto de las cajas en las que el material estaba más disperso. Esto va ligado directamente con la actividad microbiana siendo evidente que en presencia de lombrices la degradación se da en condiciones aerobias, mientras que en las concentraciones con más del 10% de gallinaza se

crean condiciones anaeróbicas por la relación C:N de la gallinaza que es de 8.47, representando un contenido de nitrógeno alto en relación al carbono; dicho de otra manera, la relación C:N es baja, ocasionando el desarrollo rápido de organismos que aceleran la descomposición y que provocan una rápida disminución de la cantidad de oxígeno. Una parte de ese exceso de nitrógeno se convierte en amoníaco gaseoso perdiendo el nitrógeno necesario para el crecimiento de la comunidad microbiana (Alexander, 1980).

Tabla 3.5. Tolerancia de las lombrices *Eisenia foetida* a diferentes concentraciones de gallinaza donde x=bagazo, y=gallinaza, z=tierra negra. Las muestras marcadas con (*) fueron las que conservaron el mismo número de lombrices iniciales, el resto no presentó lombrices después de 24 horas.

1 A	1 B	1 C*
x = 60	x = 60	x = 60
y = 40	y = 30	y = 0
z = 0	z = 10	z = 40
2 A	2 B	2 C*
x = 70	x = 70	x = 70
y = 30	y = 20	y = 0
z = 0	z = 10	z = 30
3 A	3 B*	3 C*
x = 80	x = 80	x = 80
y = 20	y = 10	y = 0
z = 0	z = 10	z = 20

El tiempo total del proceso de vermicomposteo fue de 90 días en todas las unidades experimentales, después del cual se obtuvo un producto de color oscuro, textura fina y con olor a tierra húmeda, como se ha descrito (Singh y Sharma, 2003; Ramachandran y Subramanian, 2004), además de presentar valores de nitrógeno, fósforo y potasio que le dan al producto características de abono orgánico (tabla 4.5). Estas características fueron obtenidas sin que la materia orgánica utilizada para el proceso de vermicomposteo fuera sometida a un proceso de pre-composteo como en la bibliografía, en donde la materia orgánica a la que se añaden las lombrices ha pasado por un periodo de aproximadamente un

mes en condiciones aerobias de compostaje para la estabilización de su temperatura alrededor de 20°C (Rodríguez-Macías *et al.*, 2004; Santamaría-Romero *et al.*; Corlay *et al.*, 1999)

En cuanto al porcentaje de carbono orgánico total y porcentaje de nitrógeno, como indicadores de actividad microbiana, se observó un aumento constante desde el inicio del proceso en cada uno de los tratamientos. A partir del segundo mes el porcentaje de nitrógeno y carbono orgánico total disminuyó sin llegar a valores menores a los iniciales (fig.10.5), la actividad microbiana es más evidente en la muestra con mayor cantidad de bagazo (3C= 80:20:0) probablemente debido a que este residuo es una fuente importante de carbono al degradarse, además del carbono que proviene del mucus de las lombrices, que de acuerdo a Scheu (1991) es una vía importante de aporte de este elemento que excede la pérdida por respiración de las lombrices. Además, es la única concentración que presentó una relación C:N (26.39) dentro de los límites (25 – 35) sugeridos como óptimos (Corlay *et al.*, 1999).

Tabla 4.5. Porcentaje de N, P, K y COT en el producto final del vermicomposteo para los diferentes tratamientos aplicados: 1C= (60:40:0); 2C= (70:30:0); 3C= (80:20:0); y 3B= (80:10:10), (bagazo: tierra: gallinaza).

Muestra	%N	%P (P ₂ O ₅)	%K(K ₂ O)	%COT
1C	1,27	1,16	0,89	28,5
2C	1,18	0,89	0,9	28,6
3C	1,24	1,27	1,09	32,72
3B	1,25	1,1	0,89	25,08

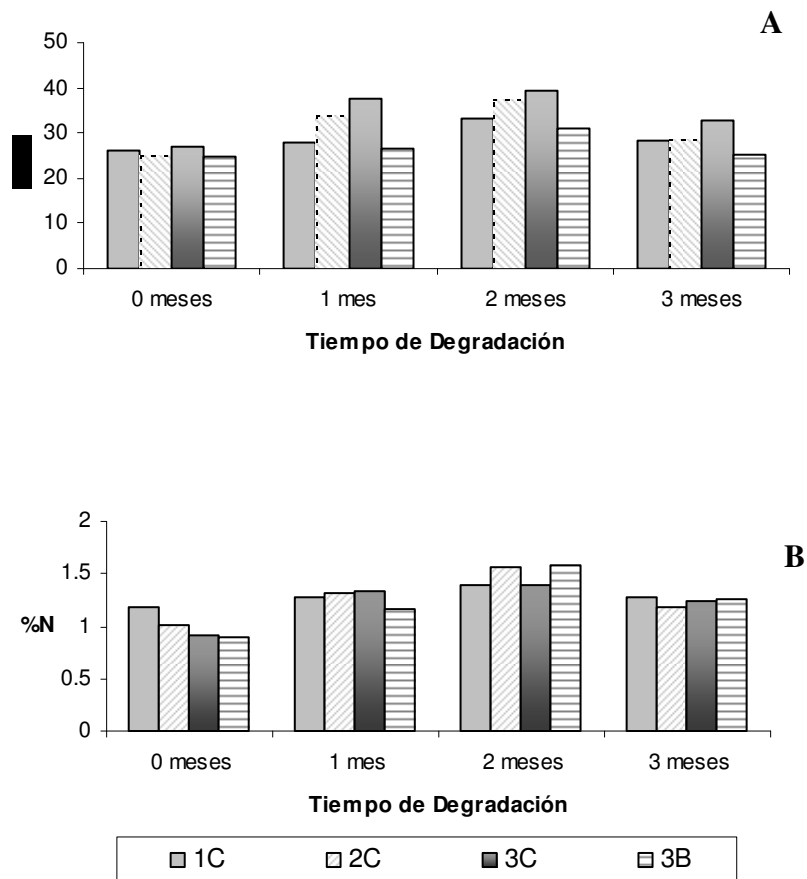


Figura. 10.5. Variación del porcentaje de COT (A) y Nitrógeno (B) para los tratamientos establecidos: 1C= (60:40:0); 2C= (70:30:0); 3C= (80:20:0); y 3B= (80:10:10), (bagazo: tierra: gallinaza).

La fuente de nitrógeno de todas las muestras proviene principalmente de la orina de las lombrices (Scheu, 1991), en el caso de la muestra 3B, el nitrógeno contenido en la vermicomposta proviene también de la gallinaza. De acuerdo a Elliot *et al.* (1990, 1991) la tasa de desnitrificación de los excrementos de las lombrices es mayor a la del suelo sin lombrices, contribuyendo a la pérdida del nitrógeno del sistema, y por otra parte, a la protección de carbono y nitrógeno a largo plazo por la formación de agregados estables de los excrementos de las lombrices. El porcentaje más alto de nitrógeno se observa a los dos meses de degradación (fig. 10.5), es en este tiempo donde se pudo dar una mayor

degradación de la celulosa dentro del proceso de descomposición de bagazo ya que, el nivel de nitrógeno en el humus es un factor limitante para la degradación de la celulosa (Alexander, 1980).

La relación C:N (fig. 11.5) de las muestras compuestas de bagazo y tierra se mantuvieron constantes a diferencia de la muestra 3B (80:10:10) que al inicio del proceso presentó una relación C:N alta (27.56), y posteriormente disminuyó y se mantuvo constante hasta el final del proceso (20.06). Los valores de carbono orgánico y nitrógeno disminuyeron al final del proceso de vermicomposteo, situación ya descrita (Hoitink y Kuter, 1986; Santamaría-Romero *et al.*, 2001) en la que se menciona que la relación C:N no funciona como indicador de madurez de compostas, pues la relación lignina/celulosa hace variar la tasa de descomposición de los residuos.

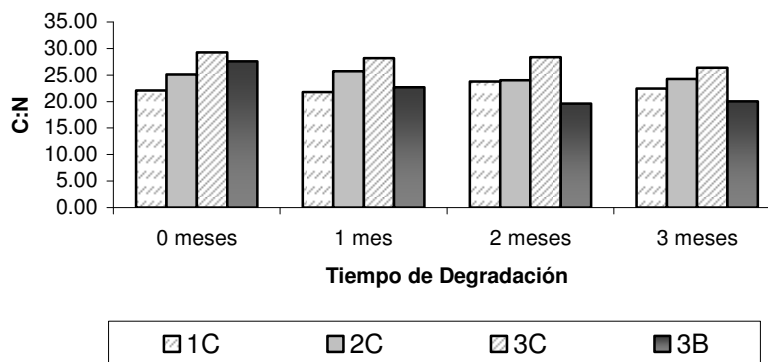


Figura. 11.5. Relación C:N para cada una de las muestras: 1C= (60:40:0); 2C= (70:30:0); 3C= (80:20:0); y 3B= (80:10:10), (bagazo: tierra: gallinaza).

5.2 Estudio Microbiológico

En los medios utilizados no se observó crecimiento de actinomicetos, sería necesario hacer pruebas con otros medios selectivos. Al inicio del proceso de vermicomposteo se llegaron a separar un total de 12 colonias de bacterias y 4 de hongos, sin embargo en cada caja petri la mayor actividad microbiana se observó en los hongos que mostraron un mayor crecimiento en comparación con el de las colonias de bacterias las cuales tuvieron las mismas condiciones de temperatura y tiempo de incubación; en los inóculos al final del proceso de vermicomposteo se separaron 16 colonias de bacterias y 3 de hongos, en esta etapa se observó mayor crecimiento de las colonias de bacterias que de las de hongos (Anexo A), situación que Rodríguez-Macías *et al.* (2003) interpretan como un factor dado por el pH alcalino en el cual se desarrollan mejor las bacterias que los hongos (Alexander, 1980), sin embargo la actividad de hongos por la influencia de las lombrices pudiera volverse más eficiente ya que también se ha reportado que la disminución de la biomasa se da junto con una mayor actividad microbiana (Wolters y Joregensen, 1992).

Para el establecimiento de parámetros de control específicos en el vermicomposteo de bagazo de *Agave tequilana*, resultaría de utilidad identificar los diferentes géneros y/o especies implicados en las etapas del proceso de degradación, apoyándose en la contribución del presente trabajo de investigación y en los conocimientos ya existentes sobre la dinámica microbiana en el vermicomposteo de bagazo de la misma especie, logrando así una sistematización del proceso que permita un eficiente aprovechamiento de los residuos orgánicos de la industria tequilera y a su vez, mejorando la calidad del producto final obtenido como fertilizante orgánico.

5.3 Estudio Histológico. Descripción Anatómica de la piña de *Agave tequilana*.

La región basal de la hoja (M1= muestra 1) en sección transversal, presenta la epidermis constituida por una capa sencilla de células de forma rectangular. No se observan estomas a lo largo de toda esta sección.

El tejido que le da al *Agave* su resistencia y flexibilidad característica está constituido por fibras de esclerenquima, con paredes celulósicas gruesas y lignificadas según la ubicación de la fibra. En la región M1 (base de las hojas), las fibras están fuertemente impregnadas de lignina mientras que en la región del tallo (M2 y M3) no es tan evidente esta lignificación. Las fibras se encuentran siempre asociadas a los tejidos de conducción, formando paquetes en forma de casquete por encima de los haces vasculares (fig 12.5).

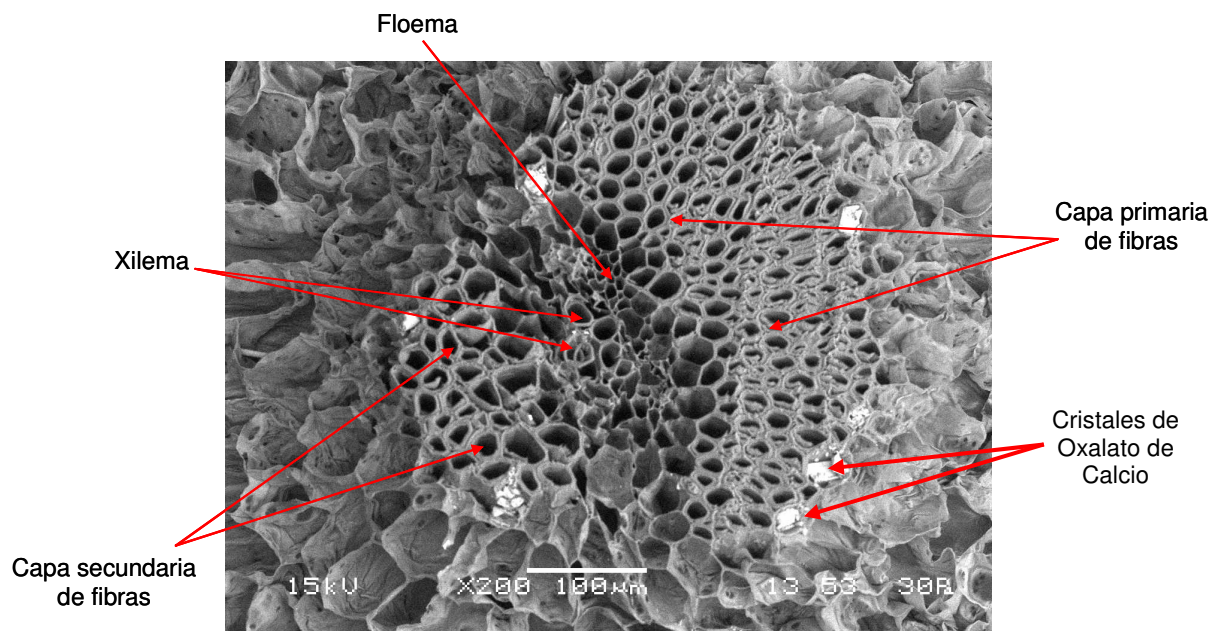


Figura 12.5 Fotografía de microscopía electrónica de barrido a 200x donde se muestra un haz vascular de la base de la hoja de *Agave tequilana* y las células que lo componen.

Los tejidos de conducción están constituidos por xilema y floema, éstos se encuentran organizados en forma de haces vasculares. El xilema presenta característicamente traqueidas y elementos de vaso con paredes primarias y secundarias lignificadas. El floema por su parte, esta compuesto fundamentalmente por células cribosas.

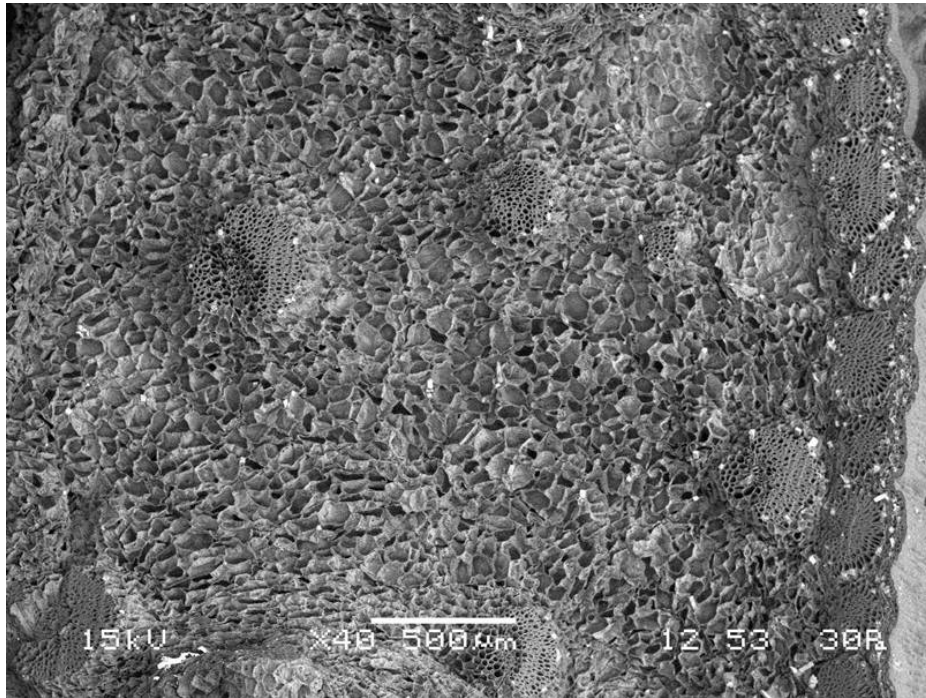


Figura. 13.5. (40x) Arreglo de los haces vasculares en la base de la hoja de *Agave tequilana* característico de monocotiledóneas.

Se observó que en *A. tequilana* como en las demás monocotiledóneas, los haces vasculares están dispersos en el tejido (Fig. 13.5). Estos haces vasculares se presentan en diferentes arreglos de forma similar a lo reportado para *A. sisilana* (Blunden, 1973) y que se describen a continuación:

- A) Cada haz vascular se encuentra en la parte interna de un paquete de fibras que forman un arco o casquete y que según su tamaño se les ha llamado primarias y secundarias, el paquete primario es de mayor tamaño que el secundario (fig 12.5).
- B) Igual a A pero el casquete secundario de fibras ausente. El floema nunca encierra por completo a las células del xilema (Fig. 14.5).

- C) Como en B. Sin casquetes de fibras primarias y secundarias (Fig. 15.5).
 D) Compuesto de fibras y floema.

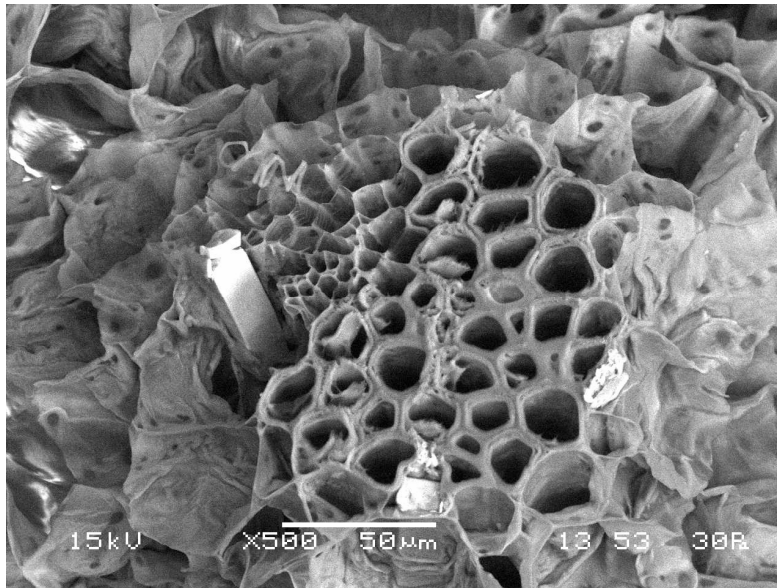


Figura. 14.5. (500x) Arreglo del haz vascular sin casquete secundario de fibras. Se observan también algunos cristales de oxalato de calcio, células cribosas y elementos de vaso.

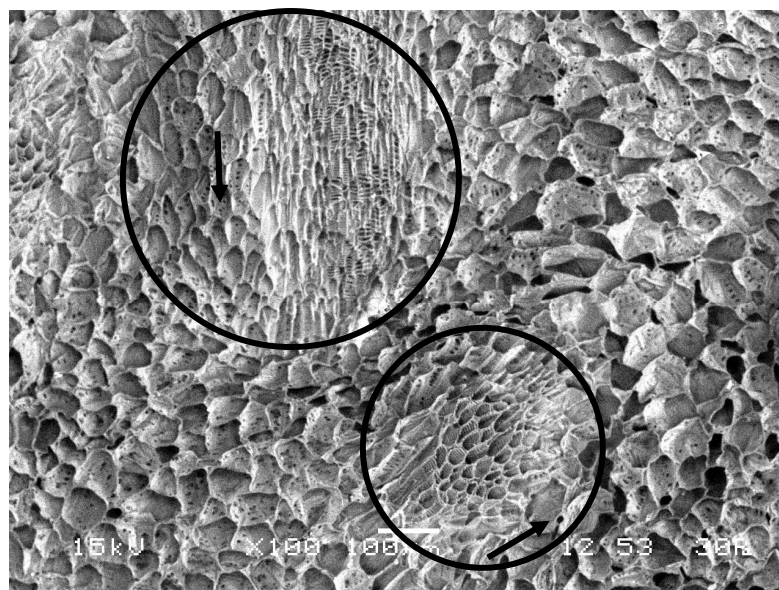


Figura 15.5. (100x) Arreglo de los haces vasculares en un corte transversal de tallo de *Agave tequilana* que a diferencia de los haces vasculares de la región basal de la hoja no presentan un arreglo en una sola dirección.

En la región basal de la hoja (M1) en corte transversal, se observó característicamente el arreglo A, aunque también son evidentes el B y D. Por otra parte, en la muestra dos (M2) se observaron los cuatro tipos de arreglos, siendo evidente en las dos muestras del tallo (M2 y M3) que los haces no tienen un acomodo paralelo en relación al tallo (Fig. 15.5). Finalmente en la muestra tres (M3) los haces vasculares son menos evidentes predominando células con paredes gruesas y con punteaduras. En el caso de las tres muestras la lignificación de los elementos de vaso es en forma helicoidal, escaleriforme y punteado.

En las tres regiones se observan cristales delgados o rafidios organizados en haces; además, se presentan cristales prismáticos paralelos con ángulos transversales rectos, acomodados individualmente en espacios intercelulares compuestos de oxalato cálcico (Fig. 12.5 y 14.5), que de acuerdo con Fahn (1982) y Blunden (1973) son los más comunes, resultado de los procesos metabólicos celulares.

5.4 Seguimiento del Proceso de Degradación por MEB, Análisis Histológico y Microbiológico de las fibras de *Agave tequilana*.

Las observaciones por microscopía electrónica de barrido se describen por etapas divididas en: tiempo 0, tiempo 1, tiempo 2 y tiempo 3 las cuales corresponden a una fase inicial, a un mes, dos y tres meses de proceso de vermicomposteo respectivamente. Resulta difícil estimar la biomasa correspondiente a cada grupo microbiano, sin embargo a lo largo de todo el proceso se observaron hifas y cúmulos bacterianos que influyeron en la degradación. Cabe mencionar que el término fibra utilizado en la siguiente descripción se refiere al término utilizado comercialmente.

TIEMPO 0. Inicio del proceso.

Se observan fibras con apariencia cilíndrica que, desde el punto de vista botánico corresponden a haces vasculares compuestos por células conductoras (xilema y floema) y de soporte (esclerenquima) presentando diferentes tamaños (Fig. 16.5) según su función en la planta viva. Las células en esta etapa o tiempo cero presentan pared celular bien definida compuesta principalmente de microfibrillas de celulosa sin un acomodo aparente además de hemicelulosa y proteínas. Se pueden observar plasmodesmos que son conductos entre las paredes primarias de dos células vivas, a través de ellos se unen las membranas de las dos células vecinas. Las células que llegan a presentar paredes secundarias (se observan como paredes con engrosamientos principalmente en células de soporte y xilema) están compuestas de microfibrillas de celulosa ordenadas e impregnadas de lignina, dando rigidez y resistencia al tejido. Se distinguen también cristales rectangulares de oxalato de calcio en espacios intercelulares a lo largo de toda la fibra.

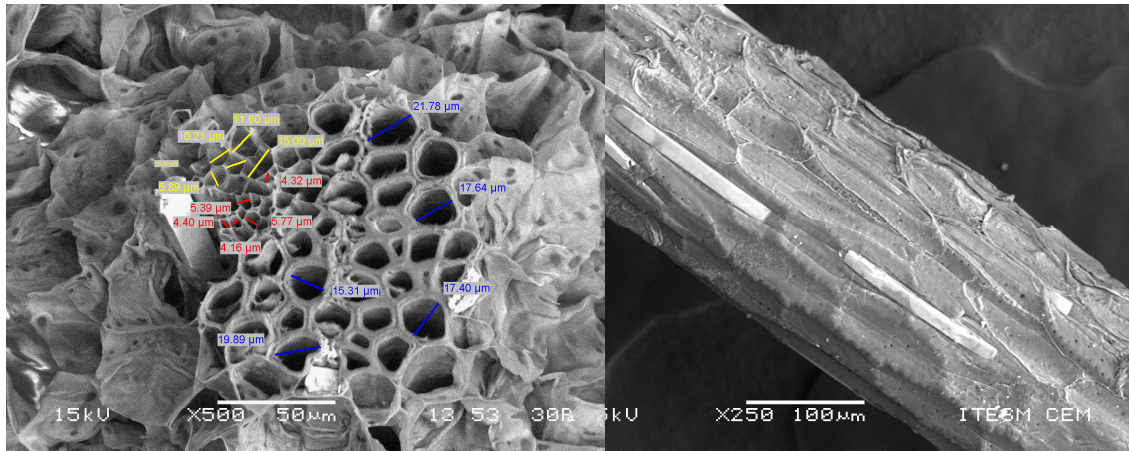


Figura 16.5. A la derecha (500x), haz vascular, en ella se observan células de diferente tamaño y engrosamiento de sus paredes celulares (amarillo=xilema, rojo=floema y azul=esclerénquima rodeados por células de parénquima). Izquierda (250x), se pueden apreciar en las dos fotos algunos cristales de oxalato de calcio en espacios intercelulares rodeando al haz.

TIEMPO 1. Un mes de degradación.

Se observan los elementos típicos que conforman las fibras de agave con una disposición aún ordenada aunque fracturadas y cubiertas por cúmulos bacterianos e hifas de hongos de 1.6 a 6.9µm de ancho y longitud indefinida, estos microorganismos pudieran ser los responsables de la degradación de los compuestos carbonados simples. Además, se observan cristales rectangulares y algunos cristales cilíndricos de menor tamaño (Fig. 17.5).

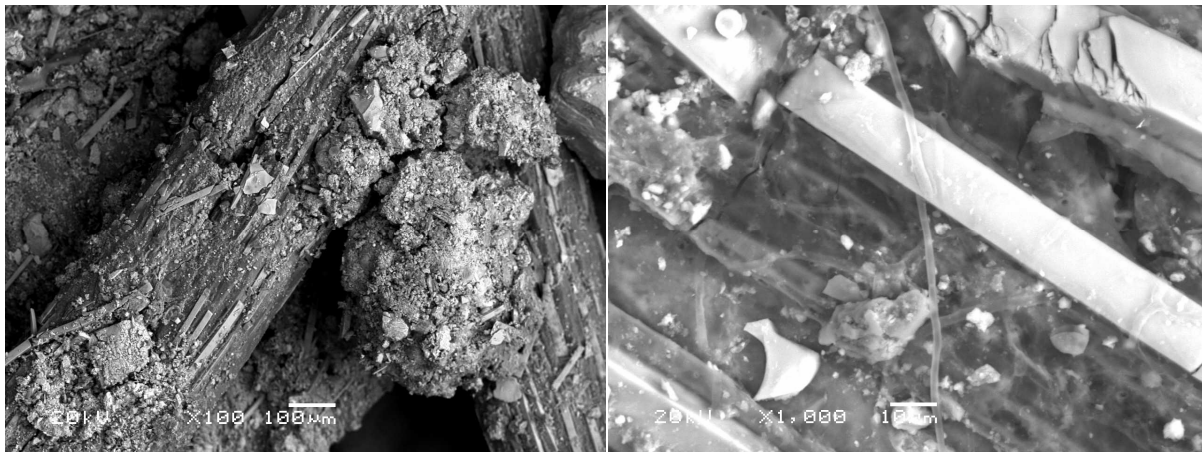


Figura 17.5. Izquierda (100x), apariencia fracturada de las fibras de *Agave tequilana* y cubiertas por cúmulos bacterianos y a la derecha, la presencia de cúmulos bacterianos e hifas de microorganismos degradadores (1,000x).

TIEMPO 2. Dos meses de degradación.

Ya no se observan células de parénquima que presentan paredes primarias delgadas de celulosa, probablemente han sido degradadas lo cual da una apariencia de desorden a los elementos de los haces vasculares que empiezan a dispersarse por la acción de los microorganismos presentes. Las paredes celulares de los tubos cribosos (floema) se observan degradados en algunas secciones así como las paredes primarias de algunos elementos de vaso. La fibra ya no muestra una forma uniforme, adheridos a esta, se observan probables cúmulos bacterianos, hifas y partículas de silicio, entre otros elementos propios del suelo. Los dos tipos de cristales compuestos de calcio observados en los tiempos anteriores ahora están mas juntos, probablemente con el proceso de degradación se van acumulando (Fig. 18.5).

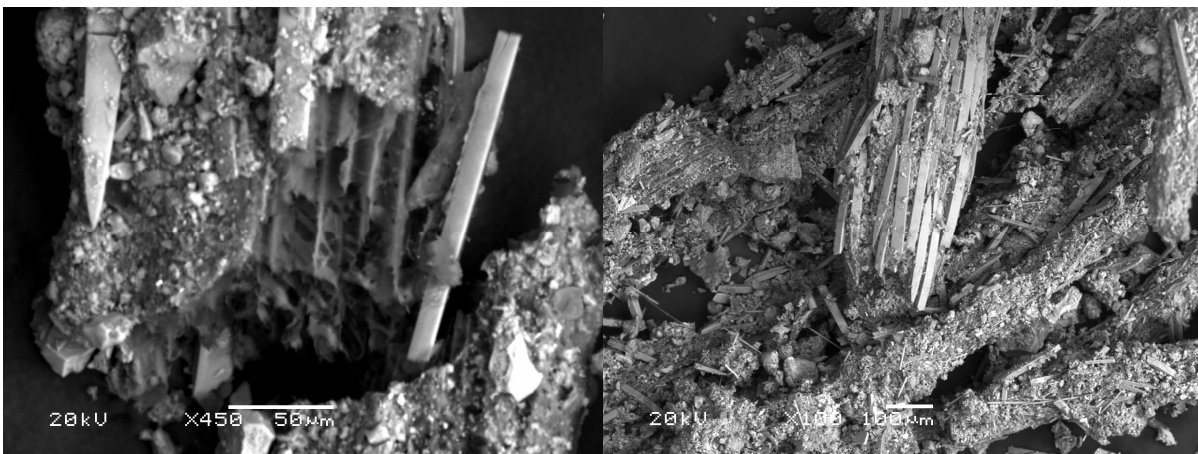


Figura 18.5. Izquierda (450x) tubos cribosos con paredes celulares incompletas como resultado de la actividad microbiana. Derecha (100x) elementos que conforman a las fibras seccionados y dispersos y con acumulaciones de cristales de oxalato de calcio.

TIEMPO 3. Tres meses de degradación, producto final.

La fibra ya no muestra una estructura cilíndrica uniforme, los elementos de la misma (haces vasculares) se encuentran dispersos por lo que incluso el diámetro de la misma es evidentemente menor en comparación con las fibras observadas al principio de la degradación. Posiblemente los haces vasculares restantes sean de xilema debido a la fuerte lignificación de sus paredes celulares secundarias al igual que las células de soporte o esclerénquima que también presentan paredes gruesas y lignificadas. En esta etapa todavía se observan cúmulos bacterianos e hifas de hongos que pudieran ser microorganismos específicos responsables de la degradación de los elementos más complejos que quedan al final de este proceso (lignina y celulosa). Es en esta etapa en donde el producto del proceso de vermicomposteo del presente trabajo de investigación, físicamente presenta características propias del humus de lombriz utilizado como mejorador de suelos y que han sido descritas anteriormente (ver Pág. 33; Fig. 19.5).

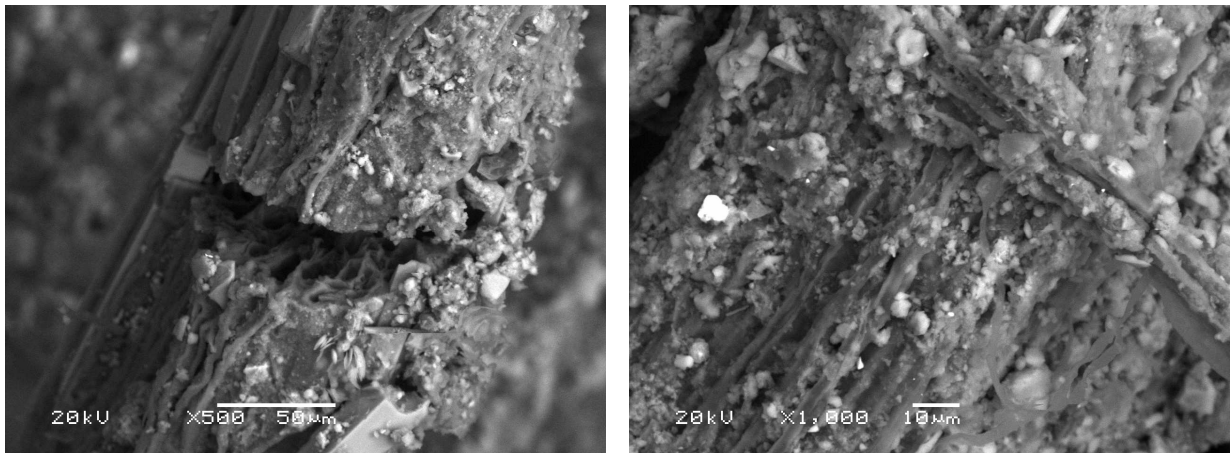


Figura 19.5. Izquierda (500x), células de esclerénquima con paredes celulares gruesas y fuertemente lignificadas, rodeadas por evidentes cúmulos bacterianos, a la derecha a 1,000x se observan hifas de hongos.

6. CONCLUSIONES

- Las concentraciones (60:40:0), (70:30:0), (80:20:0) y (80:10:10): (bagazo: tierra: gallinaza) junto con el control de las condiciones del porcentaje de humedad permitieron disminuir el tiempo de vermicomposteo.
- Las lombrices no toleran concentraciones mayores a 10% de gallinaza en el sustrato en el que se encuentran.
- La gallinaza aplicada en un 10% en combinación con bagazo se degrada eficientemente.
- El contenido de 80% de bagazo con 20% de tierra negra fue la proporción con mayor actividad microbiana y una relación C:N mas estable.
- Se reconocieron 3 etapas de degradación en las fibras del agave por MEB:
 1. Degradación de celulosa de las paredes de células externas del haz vascular.
 2. Degradación de celulosa en células internas del haz y pérdida de arreglo celular.
 3. Degradación de lignocelulosa, celulosa y hemicelulosa, pérdida de estructura celular.
- El seguimiento del proceso de degradación por MEB complementado con estudios microbiológicos e histológicos podría llegar a ser utilizado como parámetro de control en el proceso de vermicomposteo del bagazo de agave.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Rodríguez, S. 1998. Técnicas de Laboratorio para el estudio de las embriofitas. En: Tejero, D.J.D. y Granillo V.M.P. (eds.). PLANTAE: Introducción al estudio de las plantas con embrión. Segunda Edición. UNAM. Campus Iztacala. Carrera de Biología. 249 - 270 pp.
- Alexander, M. 1980. Introducción a la Microbiología del Suelo. AGT Editor, S.A. México, D.F.
- Arancon, N. Q., Edwards, C.A., Bierman, P., Metzger, J.D., Lee, S., Welch, C. 2003. Effects of Vermicompost on growth marketable fruits on field-grown tomatoes, peppers and strawberries. *Pedobiologia* 47, 731 – 735 pp.
- ASM Handbook, 1992. Metallography and Microstructures. Ninth Edition, Metals Handbook, American Society for Metals; Vol. 9.
- Blunden, G., Yi Yi. 1973. The comparative leaf anatomy of *Agave*, *Beschorneria*, *Doryanthes* and *Furcraea* species (Agaveceae: Agaveae). *Bot. J. Linn. Soc.*, 66: 157-179 pp.
- Borazjani, H., Dile, S.V., Stewart, H. S., Brasher, K. 2004. Composting Research Targets Forest Products and Poultry Industries. *Biocycle*. Emmaus. Vol. 45(5), 42-44 pp.
- Bowen, R.M. and Harper, S.H.T. 1989. Fungal populations on wheat straw decomposing in arable soils. *Mycological Research*. 93: 47-54 pp. In: Edwards, C.A. (Ed.). 2004. *Earthworm Ecology*. 2nd Edition CRC Press. Boca Raton, F1 456 p.
- Bowen, R.M. 1990. Decomposition of wheat straw by mixed cultures of fungi isolated from arable soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 22: 401-406 pp.
- Bowen, R.M. and Harper, S.H.T. 1990. Decomposition of wheat straw and related compounds by fungi isolated from straw in arable soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 22: 393-399 pp.
- Brown, G.G. 1995. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity?. *Plant and Soil* 170: 209-231 pp.
- Cámara Nacional de la Industria Tequilera (CNIT), Estadísticas Septiembre 2005. México <http://www.tequileros.org>, fecha de consulta: febrero – noviembre 2005.

- Casillas, J.A. 1996. Usos comerciales del bagazo de agave. Gaceta universitaria de la Universidad de Guadalajara. No. 15 Julio 1999.
- Chaoui, H., Edwards, C.A., Brickner, A., Lee, S. Arancon, N.Q. 2002. The BCPC Conference – Pest and Diseases. Brighton, London. 8B-3, 711 – 716 En: Arancon, N. Q., Edwards, C.A., Bierman, P., Metzger, J.D., Lee, S., Welch, C. 2003. Effects of Vermicompost on growth marketable fruits on field-grown tomatoes, peppers and strawberries. *Pedobiologia* 47, 731 – 735 pp.
- Cavender, N. D., Atiyeh, R. M., Knee, M. 2003. Vermicompost stimulates mycorrhizal colonization of roots of *Sorghum bicolor* at the expense of plant growth. *Pedobiología*. 47, 85-89 pp.
- Corlay, Ch.L., Ferrera-Cerrato, R., Etchevers, B.J.D., Echegaray, A.A., Santizo, R.A. 1999. Cinética de grupos microbianos en el proceso de producción de composta y vermicomposta. *Agrociencia* 33: 375-380 pp.
- Dane, J.H. and Topp, G.C. eds. 2002. *Methods of Soil Analysis, Part 4, Physical Methods*: Madison, WI, Soil Science Society of America, Soil Science Society of America Book Series Number 5, 1692 p.
- Dash, H.K., Beura, B.N., Dash, M.C. 1986. Gut load, transit time, gut microflora, and turnover of soil, plant, and fungal material by some tropical earthworms. *Pedobiologia*. 29: 13-20 pp.
- DOF. 1977. Declaración General de Protección a la Denominación de Origen “Tequila”. *Diario Oficial de la Federación*. 13 de octubre de 1977.
- Doube, B. M., Davoren, C.W., Hindell, R., Long, N., Cass, A. 1994. Surface cast production by the earthworm *Aporrectodea trapezoids* and the influence of organic matter on cast structural stability. 123-125 pp. In Pankhurst (ed.). *Soil biota: management in sustainable farming systems (poster papers)* CSIRO, East Melbourne, Australia. In: Edwards, C.A. (Ed.). 2004. *Earthworm Ecology*. 2nd Edition CRC Press. Boca Raton, F1 456 p.
- Edwards, C.A. (Ed.). 2004. *Earthworm Ecology*. 2nd Edition CRC Press. Boca Raton, F1 456 p.

- Edwards, C.A. y Fletcher, K.E. 1988. Interactions between earthworms and microorganisms in organic-matter breakdown. *Agriculture Ecosystems and Environment* 24: 235-247 pp.
- Elliott, P.W., Knight, D., Anderson, J.M. 1990. Denitrification in earthworm casts and soil from pasture under different fertilizer and drainage regimes. *Soil Biology and Biochemistry*. 22: 601-605 pp.
- Elliott, P.W., Knight, D., Anderson, J.M. 1991. Variables controlling denitrification from earthworm casts and soil in permanent pasture. *Biology and Fertility of soils*. 11: 24-29.
- Fahn, A. 1982. *Anatomía Vegetal*. H.Blume. Ediciones Rosario. Madrid. 95-158 pp.
- Ferruzzi, C. 2001. *Manual de Lombricultura*. Ediciones Mundi – Prensa. Madrid.
- Garrett, S.D. 1981. *Soil Fungi and Soil Fertility. An introduction to soil mycology*. 2nd. Edition. Pergamon Press. London. In: Edwards, C.A. (Ed.). 2004. *Earthworm Ecology*. 2nd Edition CRC Press. Boca Raton, F1 456 p.
- Hamman, A., Momo, F.R., Duhour, A., Falco, L. *et al.* 2003. Effect of UV radiation on *Eisenia fetida* populations. *Pedobiologia*. 47(5/6) 842-845 pp.
- Harper, S.H.T. and Lynch, J.M. 1985. Colonisation and decomposition of straw by fungi. *Transactions of the Royal Mycological Society* 85: 655-661. In: Edwards, C.A. (Ed.). 2004. *Earthworm Ecology*. 2nd Edition CRC Press. Boca Raton, F1 456 p.
- Hoitink, H.A.J. y Kuter, G.A. 1986. Effects of composts in growth media on soil borne pathogens. In: *The Role of Organic Matter in Modern Agriculture*. Chen, Y and Y. Avnimelech (eds.). Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, Netherlands. 289-306 pp.
- En: Santamaría-Romero, S., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz-Suárez, J.J., Galvis-Spinola, A., Barois-Boullard, I. 2001. Dinámica y relaciones de microorganismos, C-orgánico y N-total durante el composteo y vermicomposteo. *Agrociencia* 35, 377-384 pp.
- Hu, F., Wu, X.Q., Li, H.X., Wu, S.M. 1998. Effects of earthworm and ants on the properties of red soils (in Chinese). In: *Research on the red soil ecosystem*. China Agricultural Science and Technology Publishing House, Beijing, 276-258 pp In: Wen, B., Hu, X.Y., Liu, Y. Wang, W.S., Feng, M.H., Shan, X.Q. 2004. The role of earthworms (*Eisenia fetida*) in influencing bioavailability of heavy metals in soils. *Biol. Fertil. Soils*. 40: 181-187 pp.

- Idarraga, G., Ramos, J., Zuñiga, V., Sahin, T. y Young, R. A. 1999. Pulp and Paper from Blue Agave Waste from Tequila Production. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4450-4455 pp.
- Ilangovan, K., Linerio, J., Alvarez, E., Briones, M. y Noyola, A. 1996. Tratamiento Anaerobio de Vinazas Tequileras. Biodegradación de Compuestos Orgánicos Industriales. Instituto de Ingeniería, UNAM. México, D.F. Marzo. 38 – 51
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 2005 <http://mapserver.inegi.gob.mx/geografia/espanol/estados/jal/agri.cfm>, fecha de consulta: febrero 2005.
- Iñiguez-Covarrubias, G., Lange, S.E., Rowell, R.M. 2001a. Utilization of byproducts from the tequila industry: part 1: agave bagasse as a raw material for animal feeding and fiberboard production. *Bioresource Technology.* 77, 25-32 pp.
- Iñiguez-Covarrubias, G. y Vaca, P. 2001b. Utilización de subproductos de la industria tequilera. Parte 4. Biodegradación del intestino grueso de cerdos con bagazo de agave húmedo. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 17(2), 109-116 pp.
- Judas, M. 1992. Gut content análisis of earthworms (lumbriidae) in a beechwood. *Soil Biology and Biochemistry* 24: 1413-1418. In: Edwards, C.A. (Ed.). 2004. *Earthworm Ecology*. 2nd Edition CRC Press. Boca Raton, F1 456 p.
- Kretzschmar, A. 1998. Earthworm Interactions with Soil Organization. In: Edwards, C.A. (Ed.). 2004. *Earthworm Ecology*. 2nd Edition CRC Press. Boca Raton, F1 456 p.
- Lavelle, P. y Gilot, C. 1994. Priming effects of macroorganisms on microflora: A key process for soil function? In: Rits, K. Dighton, J, Giller, K (eds). *Beyond the biomass*. Wiley-Sayce, London. In: Edwards, C.A. (Ed.). 2004. *Earthworm Ecology*. 2nd Edition CRC Press. Boca Raton, F1 456 p.
- Lee, K.E. 1985. *Earthworms, their ecology and relationships with soils and land use*. Academic Press, Sydney.
- López, L. 2000. *Empresarios usan la Lombricultura*. Gaceta Universitaria de la Universidad de Guadalajara, México.
- Lorch, H. J., Benckieser, G., Ottow, J.C.G. 1995. Basic methods for counting microorganisms in soil and water. In: *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Edited by K. Aler and P. Nannipieri. Academic Press. P. 146 – 161.

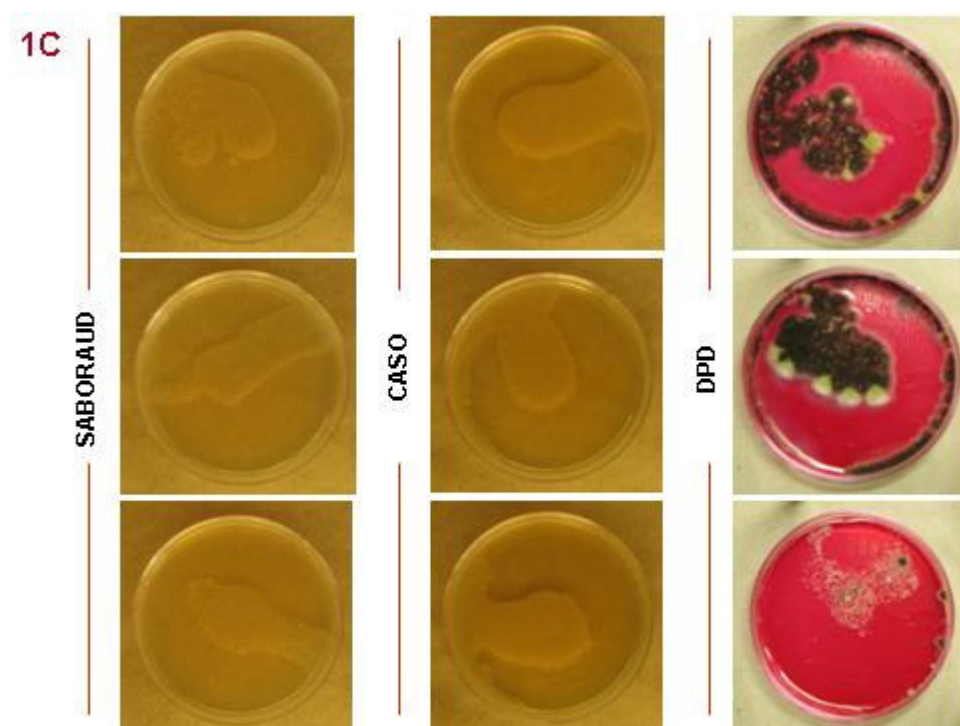
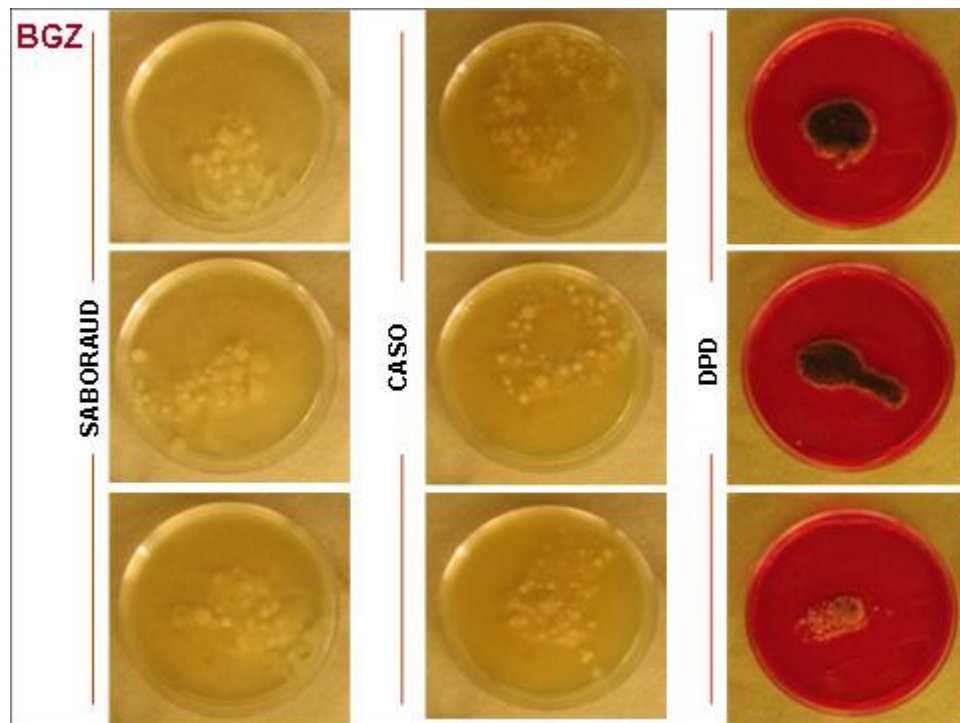
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. 1999. *Biología de los microorganismos*. 8ª. Ed. Prentice Hall Iberia. Madrid, España. 1064 p.
- Moody, S.A. 1993. Selective consumption of decomposing wheat straw by earthworms. *Soil Biology and Biochemistry* 27: 1209-1213 pp.
- Mulongoy, K. y Bedoret, A. 1989. Properties of worm casts and surface soils under various plant covers in the humid tropics. *Soil Biology and Biochemistry* 21: 197-203. In: Edwards, C.A. (Ed.). 2004. *Earthworm Ecology*. 2nd Edition CRC Press. Boca Raton, F1 456 p.
- Paul, E.A.E. y Clark, F.E. 1996. *Soil microbiology and biochemistry*. 2nd. Edition. Academic Press. San Diego, C.A. En: Rodríguez-Macías, R., Quintero-Lizaola, R., Alcántar-González, G., Ordaz-Chaparro, V., Volke-Haller, V. 2004. Dinámica y Cuantificación de Grupos Microbianos en Compost y Vermicompost de Bagazo de Agave Tequilero. *Terra Latinoamericana*. 23: 97-104 pp.
- Parmelee, R.W., Bohlen, P.J., Blair, J.M. 1998. Earthworms and Nutrient Cycling Processes: Integrating Across the Ecological Hierarchy. In: Edwards, C.A. (Ed.). 2004. *Earthworm Ecology*. 2nd Edition CRC Press. Boca Raton, F1 456 p.
- Ramírez, G. R. M., Luna, M. B., Mejía, Ch. A., Velázquez, M. O., Tsuzuki, R. G., Vierna, G. L. y Müggenburg, I. 1992. *Manual de prácticas de microbiología general*. Laboratorio de microbiología experimental. Facultad de Química, UNAM.
- Ramachandran, N., Subramanian, P. 2004. *Bio-CROP. An Enriched Organic Manure*. Tamil Nadu Agricultural University. Coimbatore.
- Rodríguez-Fuentes, H. y Rodríguez-Absi, J. 2002. *Métodos de Análisis de Suelos y Plantas*. Criterios de Interpretación. Editorial Trillas, S.A. de C.V. México. 30, 58 pp.
- Rodríguez-Macías, R., Quintero-Lizaola, R., Alcántar-González, G., Ordaz-Chaparro, V., Volke-Haller, V. 2004. Dinámica y Cuantificación de Grupos Microbianos en Compost y Vermicompost de Bagazo de Agave Tequilero. *Terra Latinoamericana*. 23: 97-104 pp.
- SAGARPA. 2000. En: página web de la Cámara Nacional de la Industria Tequilera (CNIT), México. <http://www.tequileros.org>, fecha de consulta: noviembre 2004.
- Santamaría-Romero, S., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz-Suárez, J.J., Galvis-Spinola, A., Barois-Boullard, I. 2001. Dinámica y relaciones de microorganismos, C-orgánico y N-total durante el composteo y vermicomposteo. *Agrociencia* 35, 377-384 pp.

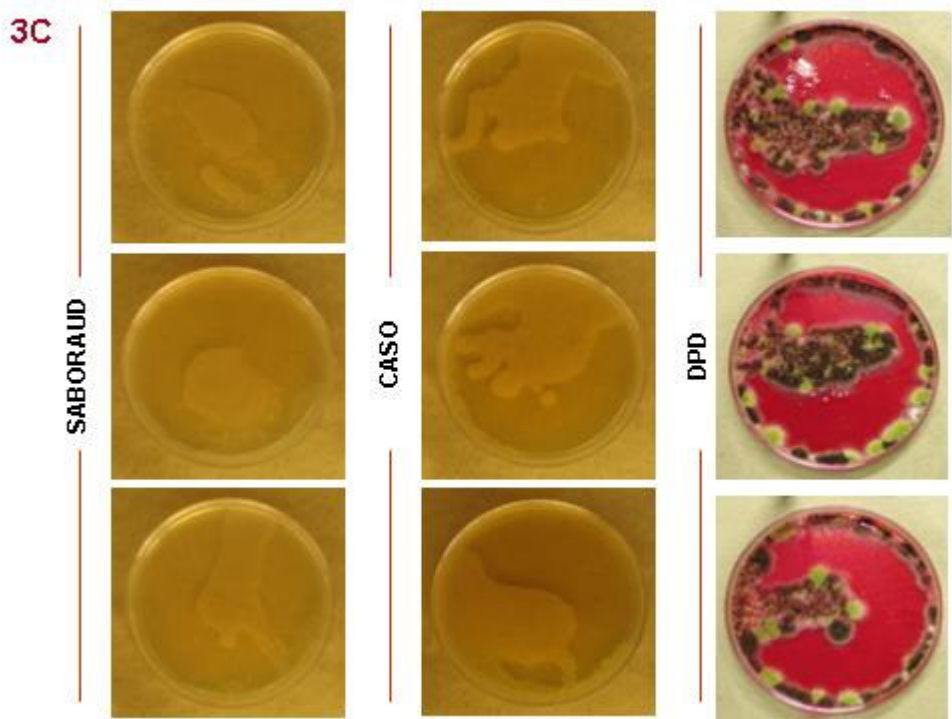
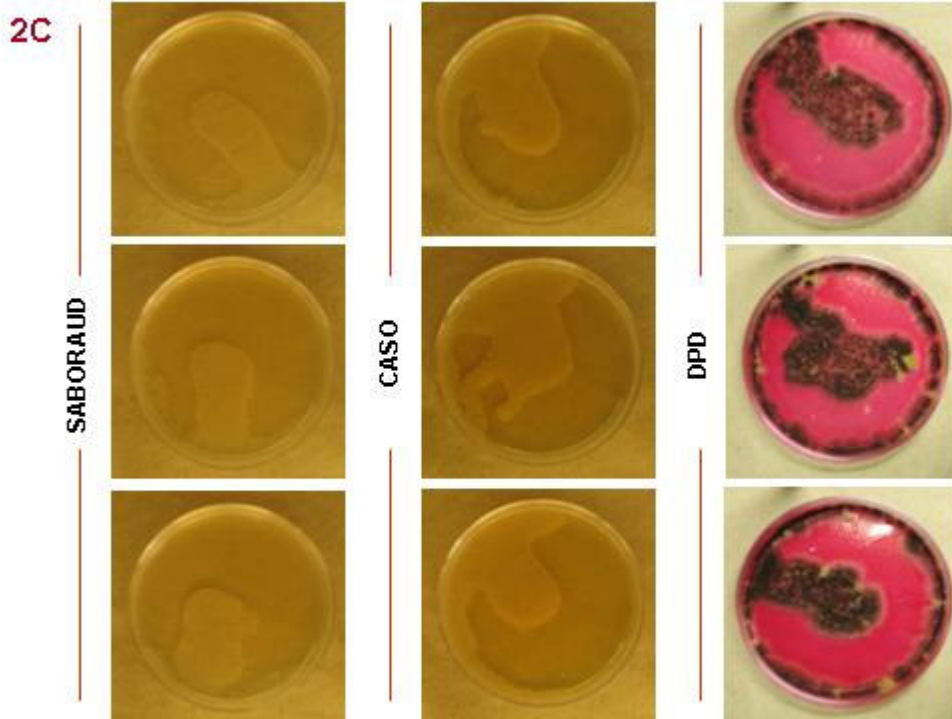
- SCFI, Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1994. NOM-006-SCFI-1994, Bebidas alcohólicas – Tequila – Especificaciones.
- Scheu, S. 1987. Microbial activity and nutrient dynamics in earthworm casts (Lumbricidae). *Biology and Fertility of Soils*. 5: 230-234 pp.
- Scheu, S. 1991. Mucus excretion and carbon turnover of endogeic earthworms. *Biology and Fertility of Soils*. 12: 217-220 pp.
- Singh, A. y Sharma, S. 2003. Effect of Microbial Inocula on Mixed Solid Waste Composting, Vermicomposting and Plant Response. *Compost Science & Utilization, ProQuest Agriculture Journals*; 11, 3. 190- 199 pp.
- Spiers, G.A., Gagnon, D., Nason, G.E., Packee, E.C. and Louiser, J.D. 1986. Effects and importance of indigenous earthworms on decomposition and nutrient cycling in coastal forest ecosystems. *Canadian Journal of Forest Research* 16: 983-989 pp.
- Svensson, B.H., Bostrom, U. Klemetson, L. 1986. Potential for higher rates of denitrification in earthworm casts than in the surrounding soil. *Biology and Fertility of Soil*. 2:147- 149 pp.
- Tejero, D.J.D. y Granillo V.M.P. (eds.). PLANTAE: Introducción al estudio de las plantas con embrión. Segunda Edición. UNAM. Campus Iztacala. Carrera de Biología. 33–47pp.
- Vázquez-Nin, G. y Echeverría, O. 2000. Introducción a la Microscopía Electrónica Aplicada a las Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias. Fondo de Cultura Económica. México. 92-120 pp.
- Wen, B., Hu, X.Y., Liu, Y. Wang, W.S., Feng, M.H., Shan, X.Q. 2004. The role of earthworms (*Eisenia fetida*) in influencing bioavailability of heavy metals in soils. *Biol. Fertil. Soils*. 40: 181-187 pp.
- Wolters, V. and Joergensen, R.G. 1992. Microbial carbon turnover in beech forest soils worked by *Aporrectodea caliginosa* (Savigny) (Oligochaeta: Lumbricidae). *Soil Biology and Biochemistry* 24: 171-177 pp.
- Zhang, H. y Schraeder, S. 1993. Earthworm effects on selected physical and chemical properties of soil aggregates. *Biology and Fertility of Soils*. 15: 229-234.

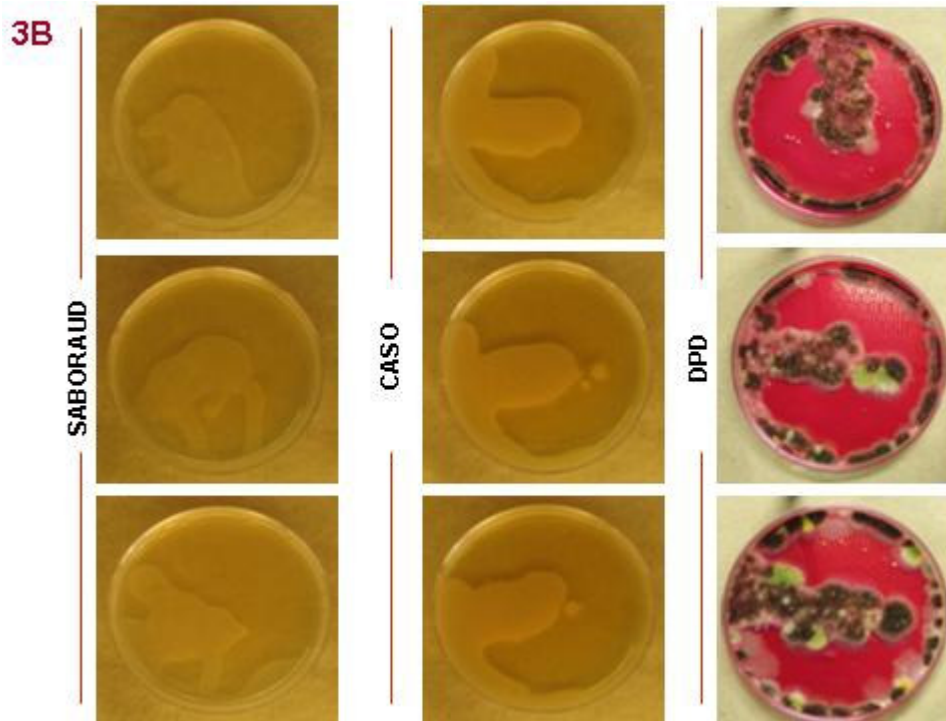
ANEXOS.

Anexo A. Microbiología.

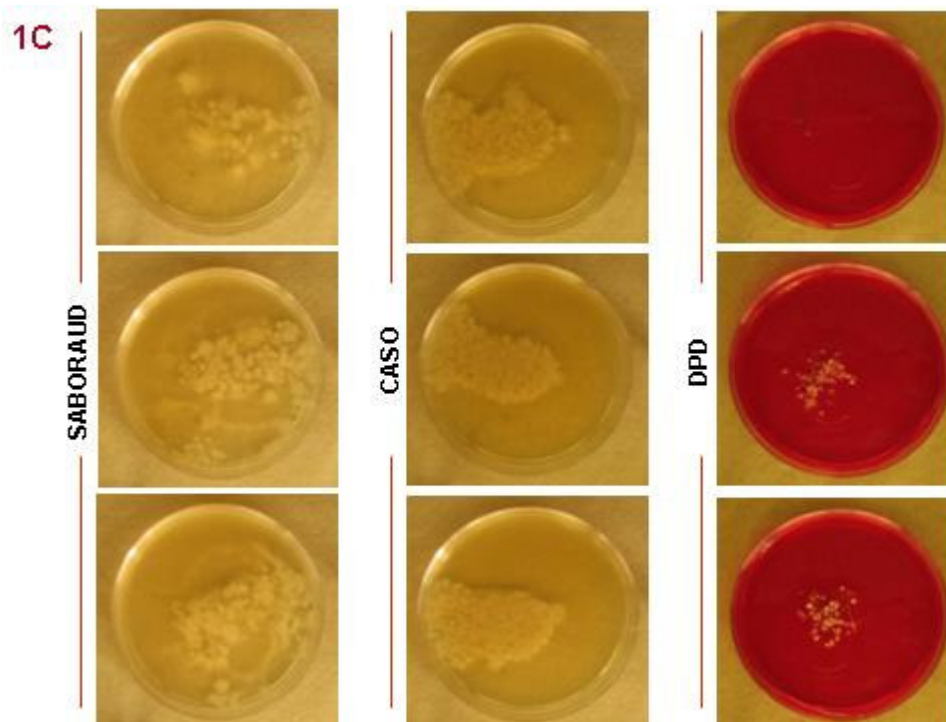
Inóculos iniciales:



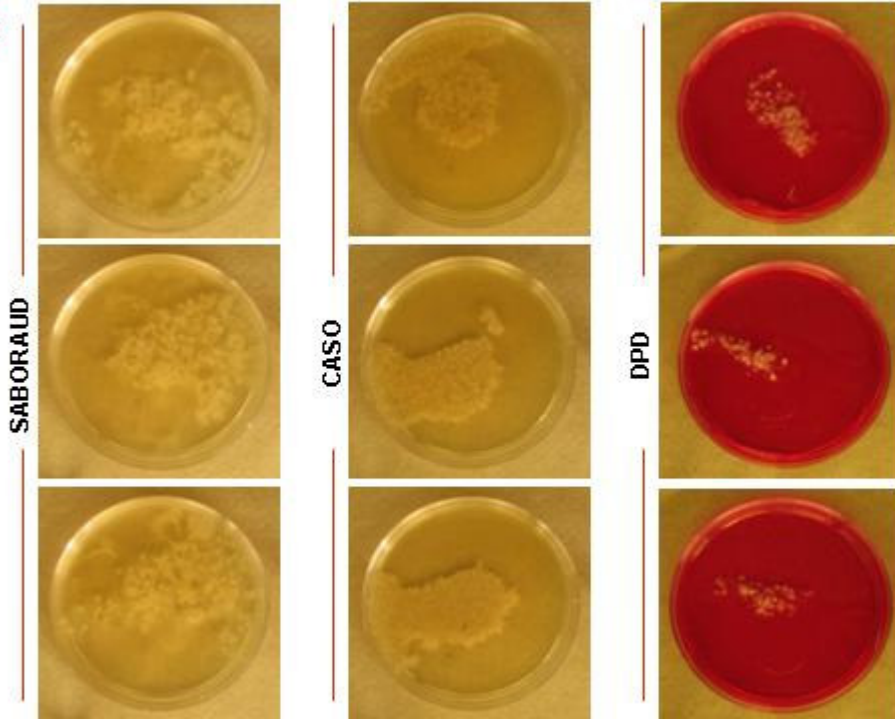




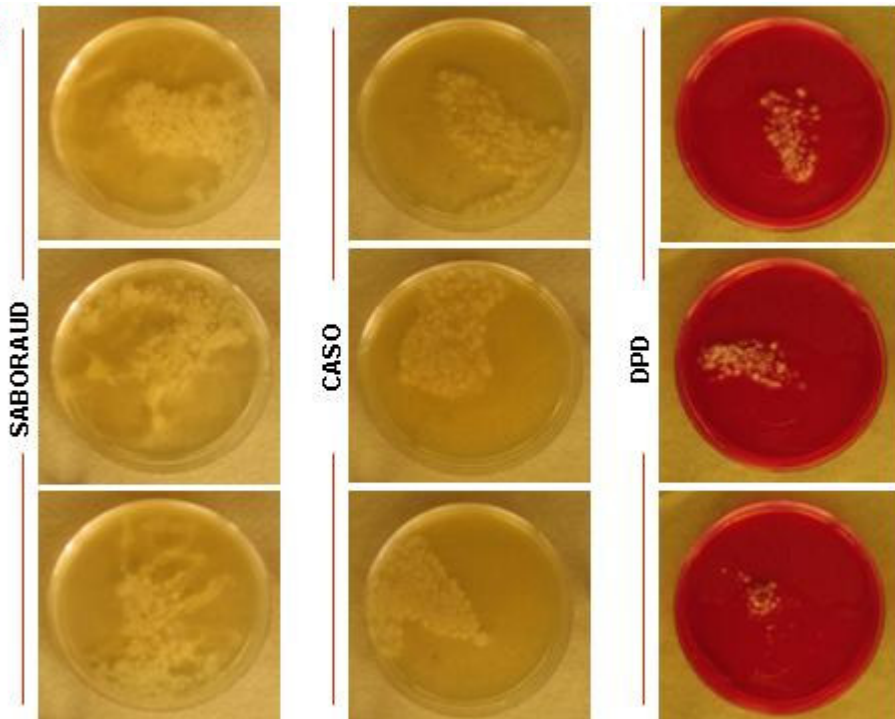
Inóculos Finales:

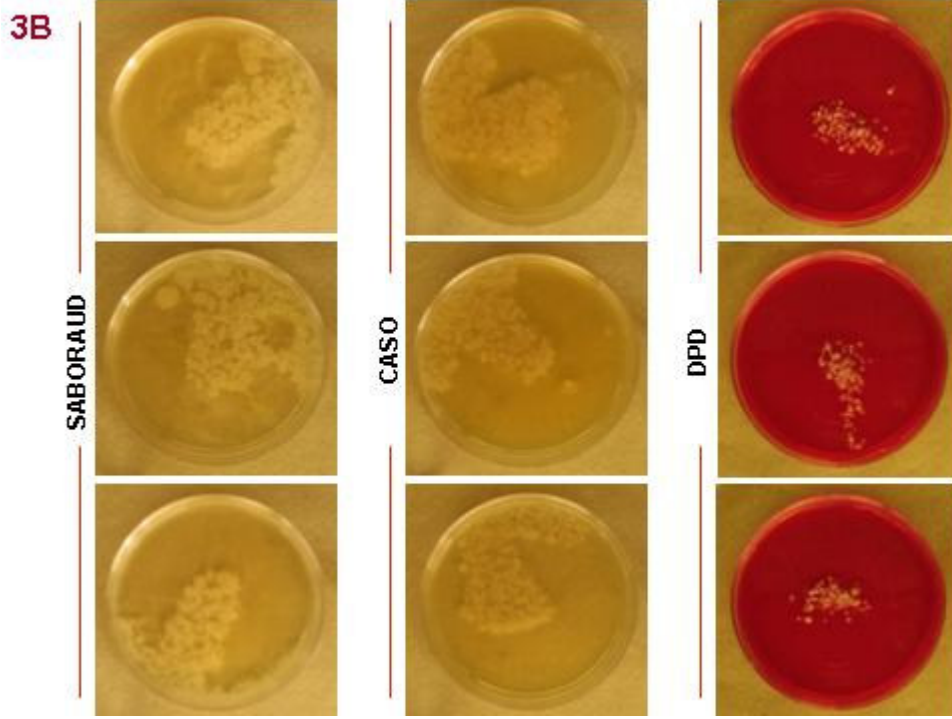


2C



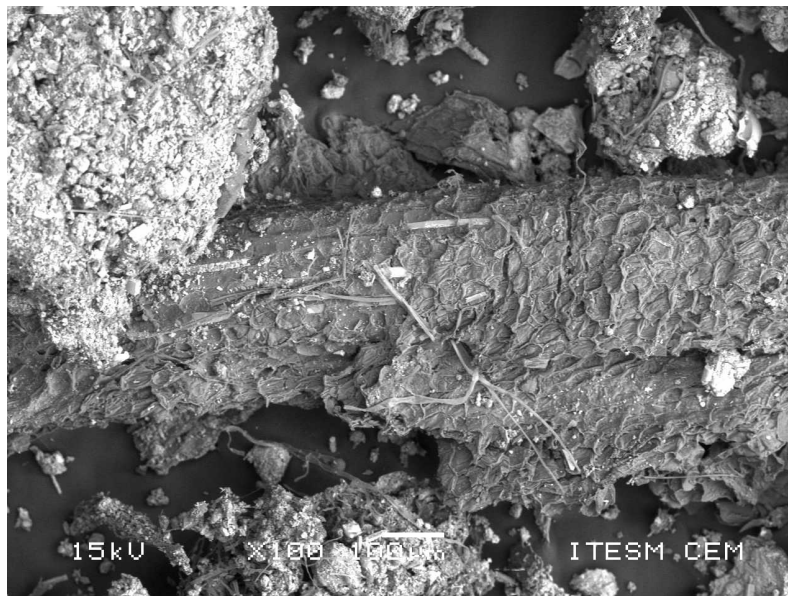
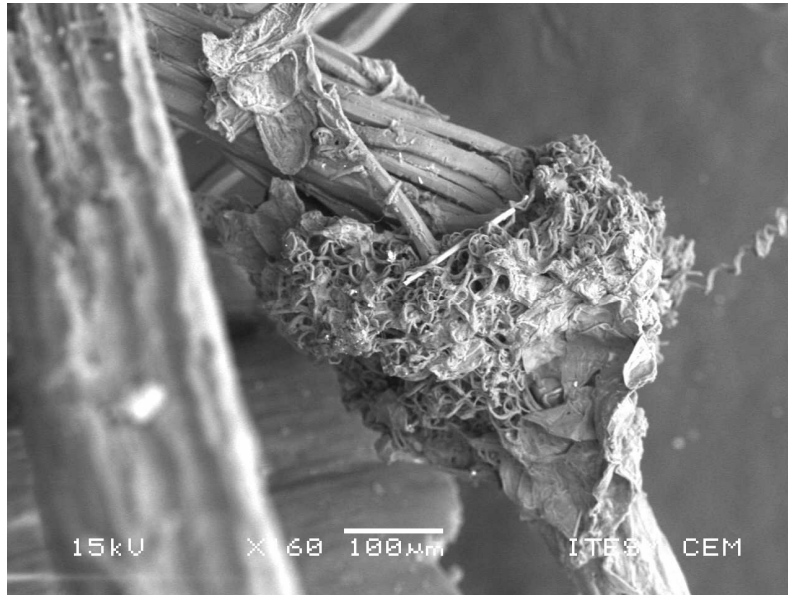
3C

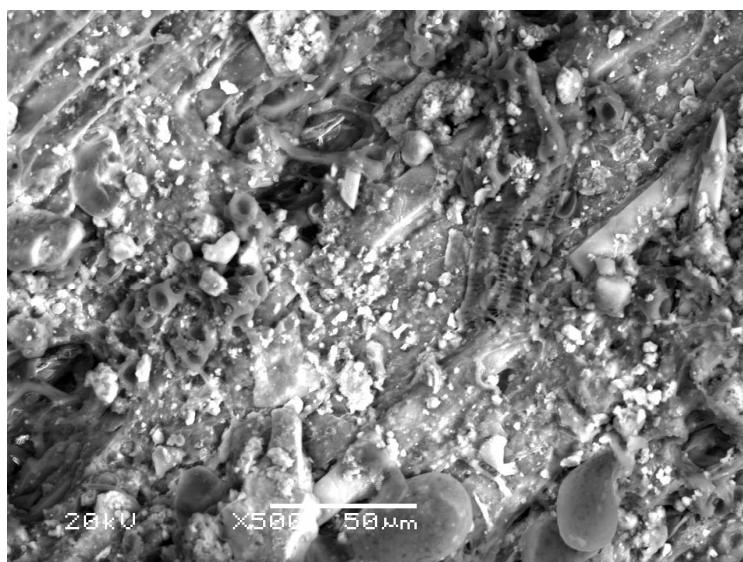
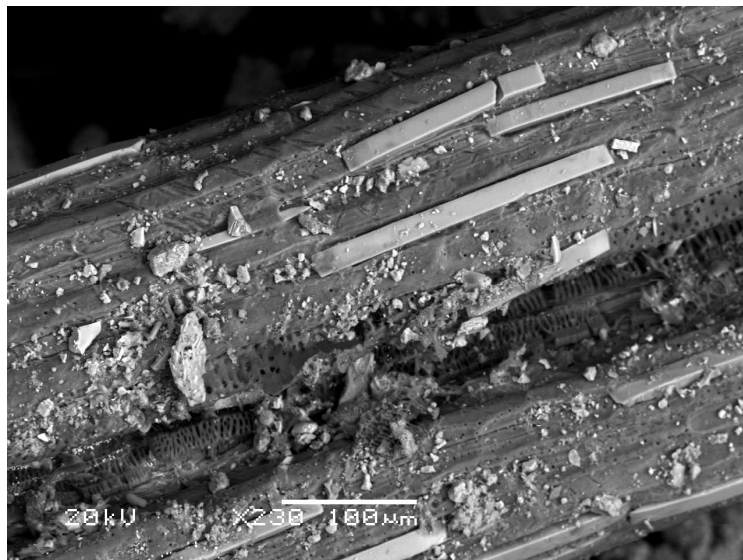
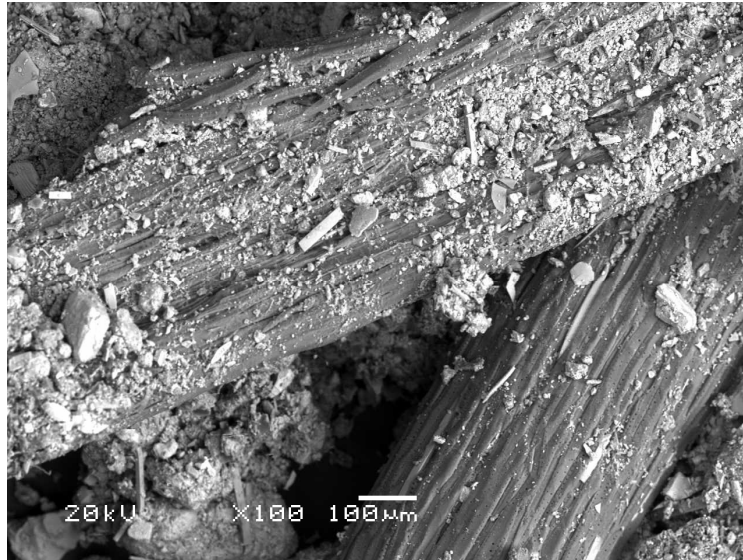




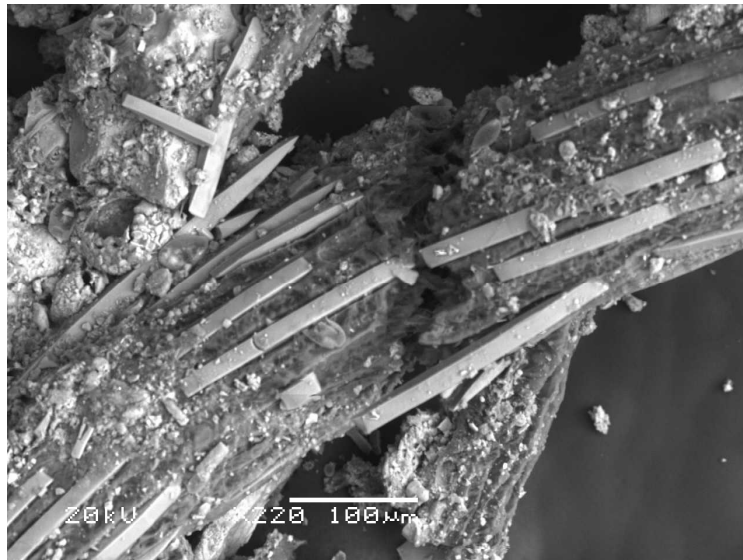
Anexo B. Microscopía Electrónica de Barrido.

Tiempo 0. Inicio del Proceso de Degradación



Tiempo 1. Un mes de degradación

Tiempo 2. Dos meses de degradación



Tiempo 3. Tres meses de degradación