

## Sumario

### Producción Vegetal

- Mecanismos de transducción de señales en plantas afectadas por salinidad y sequía  
*Signalling pathway in plants affected by salinity and drought*  
L. Chávez Suárez y R. Ramírez Fernández 157
- Efecto de la fertilización química y organomineral sobre la producción de canola en  
secano bajo labranza reducida en Michoacán, México  
*Effect of the chemical and organomineral fertilization on the production of canola in  
dry land under tillage reduced in Michoacán, Mexico*  
B.L. Gómez y M.A. Cepeda 170

### Producción Animal

- Composición química de la carne de conejo silvestre (*Oryctolagus cuniculus*) y  
viabilidad de su predicción mediante espectroscopía de infrarrojo cercano  
*Chemical composition of wild rabbit meat (Oryctolagus cuniculus) and viability  
of its prediction by near infrared spectroscopy*  
P. González-Redondo, L. Velarde Gómez, L. Guerrero Herrero y V.M. Fernández-Cabanás 184
- Aprovechamiento del estiércol de vacuno para la biorremediación *ex situ* de suelos  
contaminados por diésel en México  
*Use of bovine manure for ex situ bioremediation of diesel contaminated soils in Mexico*  
F. Manzano Agugliaro, Q.C. Hernández Escobedo y A. Zapata Sierra 197
- Efecto del contenido en nitrógeno del medio de incubación sobre la producción  
de gas y la predicción de la digestibilidad aparente de la materia orgánica de  
ensilados de hierba  
*Effect on incubation medium nitrogen content on gas production and prediction  
of apparent organic matter digestibility of grass silage*  
A. García-Rodríguez, I. Goiri, G. Flores y L.M. Oregui 208



## Mecanismos de transducción de señales en plantas afectadas por salinidad y sequía

L. Chávez Suárez y R. Ramírez Fernández

Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov", Carretera Vía Manzanillo Km 17, Bayamo. Granma, Cuba. E-mail: lchavez@dimitrov.cu

### Resumen

La salinidad y la sequía afectan considerablemente la productividad de los cultivos a escala global. La señalización de estos fenómenos en las plantas, es un proceso complejo que involucra diferentes vías y moléculas señalizadoras. En el presente trabajo se describen algunos mecanismos de transducción de señales de las plantas frente a estos tipos de estrés abiótico.

**Palabras clave:** vías transducción de señales, estrés abiotico, CDPK, MAPK.

### Summary

#### Signalling pathway in plants affected by salinity and drought

Salinity and drought affects considerably the crop productivity at world level. The signalling of these phenomena in plants, is a complex process that involucrate different pathways an signalling molecules. Some mechanisms of plant signal transduction are described in this paper against these types of abiotic stress.

**Key words:** signal transduction pathway, abiotic stress, CDPK, MAPK.

### Introducción

La sequía y la salinidad son dos de las causas fundamentales de las pérdidas de las cosechas a nivel mundial. Al igual que otros organismos vivos, las plantas han desarrollado maquinarias de señalización sofisticadas para adaptar su metabolismo celular al medio ambiente cambiante. De hecho, debido a su ciclo de vida sésil, las plantas pueden responder y protegerse a sí mismas de todas las formas de estrés abiótico. Se ha demostrado la activación de numerosas vías de transducción de señales en respuesta al estrés abiótico (Nakashima *et al.*, 2009).

El estrés se percibe primero a través de los receptores presentes en la membrana de las células vegetales (Lorenzo *et al.*, 2009). La señal es entonces transducida hacia el interior de la célula, y esto conduce a la generación de segundos mensajeros que incluyen el calcio, las especies reactivas del oxígeno (ROS) y el inositol fosfato. Estos segundos mensajeros, posteriormente modulan los niveles de calcio intracelular. Estas variaciones en los niveles de calcio intracelular son detectadas por proteínas que unen calcio, también llamadas sensores de calcio. Estos cambian su estructura de forma calcio dependiente e inician una cascada de fosfori-

lación y marcan los principales genes de respuesta al estrés o los factores de transcripción que controlan dichos genes (Klimecka y Muszynska, 2007). Los productos de estos genes conducen a la adaptación de la planta a condiciones desfavorables. Los cambios inducidos por el estrés en la expresión genética participan en la generación de hormonas tales como el ABA, el ácido salicílico y el etileno. Estas moléculas pueden amplificar la señal inicial e iniciar una segunda vuelta de señalización que pueden seguir la misma vía o utilizar diferentes componentes en la vía de señalización. Ciertas moléculas, llamadas también moléculas accesorias pueden no participar directamente en la señalización sino en la modificación o ensamblaje de otros componentes. Estas proteínas incluyen, modificadores de proteínas, que pueden realizar modificaciones postraduccionales tales como miristoilación, glicosilación, metilación y ubiquitinación (Mahajan y Tuteja, 2005).

Se han descrito varias vías de transducción de señales del estrés abiótico, y específicamente la salinidad y la sequía, entre las que se destacan la vía SOS (*salt over sensitive*), la vía de las CDPKs (*calcium dependent protein kinase*), la vía de las MAPKs (*mitogen activated protein kinase*) (Zhou *et al.*, 2007). También se ha descrito la señalización mediada por fosfolípidos. El objetivo de este trabajo es describir brevemente algunas vías de transducción de señales en plantas afectadas por la salinidad y la sequía, así como hacer referencia al papel de calcio como segundo mensajero y la regulación de los genes de respuesta al estrés por factores de transcripción.

### **Papel del calcio en la respuesta de la planta al estrés abiótico**

El papel del ión  $\text{Ca}^{2+}$  en la respuesta de las plantas a estrés abiótico resulta esencial, por su papel señalizador, su función estruc-

tural en la membrana y su efecto sobre la actividad de algunos transportadores iónicos (Klimecka y Muszynska, 2007). Es, además, un segundo mensajero involucrado en la transducción de la señal del ABA. La señalización del calcio se modula por concentraciones específicas del catión (por ejemplo, patrones en la amplitud, duración, localización y frecuencia de los picos de calcio) en respuesta a diferentes estímulos. Estos cambios en los niveles de calcio son detectados por diferentes sensores, para transducir la señal mediada por el catión en eventos posteriores de la respuesta de la planta al estrés (Zhu *et al.*, 2007). Las plantas constan de numerosas clases de proteínas sensoras de  $\text{Ca}^{2+}$ , incluyendo la calmodulina y las proteínas relacionadas, proteínas *calcineurina B-like* (CBL) y proteínas quinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (CDPK).

Un proceso celular mediado por el  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma o en el núcleo, comienza con la generación señal específica de la variación en su concentración, por una actividad sincronizada de canales, bombas y transportadores. Los cambios en el nivel citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  libre son detectados por un conjunto específico de proteínas sensoras de  $\text{Ca}^{2+}$ . La primera clase de sensores sin ningún dominio de respuesta (por ejemplo, la calmodulina y las proteínas semejantes a la calcineurina B), se une al calcio y logra cambios conformacionales que, en cambio, regulan la actividad y la función de disímiles proteínas blanco o regulan la expresión de determinados genes. Tales sensores se denominan sensores relay. Los sensores de un segundo grupo se llaman "responders", pues presentan dominios efectores (por ejemplo las proteínas quinasas) a través de los cuales ellos activan sus blancos (Reddy y Reddy, 2004). El motivo estructural *EF-hand* es el sensor predominante de calcio. Este es altamente conservado y cuenta con 29 aminoácidos y una estructura hélice-lazo-hélice, la que asemeja a una mano. El lazo

consta de 12 residuos conservados que unen al ion  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que provoca cambios conformacionales que conllevan a la exposición de paquetes hidrofóbicos, los que, en cambio, facilitan la interacción de la proteína con otras proteínas. La presencia del motivo *EF-hand* en las proteínas incrementa su estabilidad y su afinidad por el ion calcio (Klimecka y Muszynska, 2007).

Se han informado la participación del calcio en numerosos eventos de respuesta de la planta al estrés abiótico por ejemplo, la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  puede reducir la magnitud del efecto negativo de la salinidad en el crecimiento, fenómeno que se ha atribuido al efecto estabilizador de la membrana y al mantenimiento de su capacidad selectiva (Marschner, 1995). El  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular podía reducir la pérdida de  $\text{K}^+$  inhibiendo los canales de salida KORC (Murata *et al.*, 2000), y disminuir la entrada de  $\text{Na}^+$  mediante la inhibición de canales KIRC y sobre todo VIC (Maathuis y Amtmann, 1999). Por otra parte, el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular tendría un papel no menos esencial en la absorción de  $\text{K}^+$  y la selectividad  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  en condiciones salinas mediante la modulación de otros transportadores iónicos como SOS1 (Zhu, 2000). La expresión del gen *SOS1* es dependiente del complejo SOS2/SOS3, donde SOS2 es una proteína quinasa y SOS3 es una proteína sensora de  $\text{Ca}^{2+}$  (Husain *et al.*, 2008). Este aspecto será analizado más detalladamente en un epígrafe posterior. Se conoce que el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  es complejo, ya que actúa como intermediario en la cascada de señales que conducen a la transcripción de numerosos genes involucrados en la respuesta adaptativa (Chinnusamy *et al.*, 2005).

### Mecanismos de transducción de señales en plantas

#### Vía SOS

La regulación de la homeostasis iónica celular durante el estrés salino es crucial para la

tolerancia de las plantas a la salinidad. Como se plantea anteriormente una de las respuestas de las plantas frente a la salinidad y la sequía, es un incremento transitorio del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y la consiguiente activación de la expresión y/o actividad de proteínas sensoras de  $\text{Ca}^{2+}$ . La identificación de la vía SOS en *Arabidopsis thaliana* reveló componentes y mecanismos involucrados en la respuesta de la planta al estrés iónico. Análisis moleculares diferentes de mutantes sos de *Arabidopsis* condujeron a la identificación de componentes (SOS1, SOS2 y SOS3) de la vía que transduce una señal de estrés inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  para restablecer la homeostasis iónica celular (Bargmann *et al.*, 2009).

El componente SOS3 es un sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  esencial para transducir la señal de estrés inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  y para la tolerancia a la salinidad de *Arabidopsis*. SOS3 codifica una proteína que une  $\text{Ca}^{2+}$  con un motivo estructural de N-miristoilación y tres dominios *EF-hand* que unen  $\text{Ca}^{2+}$ . La secuencia aminoacídica de SOS3 mostró una semejanza significativa con la subunidad reguladora de la calcineurina de levaduras y sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  neuronales. Una mutación que reduce la capacidad de SOS3 de fijar  $\text{Ca}^{2+}$ , rinde mutantes hipersensibles a la salinidad; este defecto pudo ser parcialmente salvado por la adición de elevados niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio de crecimiento. La afinidad con que SOS3 une  $\text{Ca}^{2+}$  es menor comparada con otras proteínas que unen  $\text{Ca}^{2+}$  tales como la caltractina y la calmodulina (Ishitani, *et al.*, 2000).

La búsqueda de determinantes para la tolerancia a la salinidad también condujo a la identificación del locus SOS2 que codifica una serin-treonin-proteín quinasa, con un dominio quinasa catalítico N-terminal similar al SNF1/AMPK y un único dominio c-terminal regulador. En condiciones celulares normales, ambos dominios interactúan uno con otro, probablemente impidiendo la fosforilación del sustrato, bloqueando la entra-

da del mismo al centro activo. En presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , SOS3 activa la quinasa SOS2. El motivo estructural FISL en el dominio regulador de SOS2 es necesario y suficiente para la interacción con SOS3 y la delección de este motivo activa constitutivamente la quinasa SOS2. El cambio de la treonina 168 en el dominio quinasa, por el ácido aspártico también condujo a la producción de una quinasa SOS2 constitutivamente activa. La sobreexpresión de la forma activa de SOS2 bajo el control del promotor CaMV35S, rescata el fenotipo sensible a la salinidad tanto de SOS2 y SOS3, sosteniendo la idea de que ambas funcionan en la misma vía señalizadora de  $\text{Ca}^{2+}$  durante el estrés salino (Chinnusamy et. al., 2004).

El primer blanco de la vía SOS3-SOS2 se identificó mediante análisis genético molecular de los mutantes *sos1* en *Arabidopsis*. Al igual que *sos2* y *sos3*, el *sos1* es hipersensible a la salinidad y los tres mutantes acumulan mayores niveles de sodio que los encontrados en las plantas nativas. Se concluyó que SOS1 codifica un intercambiador (antiporter)  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la membrana plasmática, con una porción citoplasmática bien larga. El complejo quinasa SOS3-SOS2 parece que controla tanto la expresión como la actividad de SOS1. Durante el estrés salino los niveles de transcritos de SOS1 disminuyen en mutantes *sos3* y *sos2*. Se ha demostrado que el complejo quinasa SOS3-SOS2 fosforila directamente a SOS1 (Vijayan et al., 2009).

La miristoilación de SOS3 es crucial para la tolerancia a la salinidad, pues cuando esta región sufre una mutación (G2A) se produce una hipersensibilidad a la salinidad. Esto se debe posiblemente a que la miristoilación constitutiva de SOS3 permite reclutar a SOS2 hacia la membrana plasmática, acercándolo a su blanco SOS1. Otros estudios en los cuales la vía SOS fue funcionalmente reconstituida en *Sacharomyces cerevisiae*, demuestran también que la señal del estrés

salino inducida por calcio se transduce por el complejo quinasa SOS3-SOS2 para activar SOS1 y reestablecer la homeostasis iónica. También se sugiere que el eflujo de  $\text{Na}^+$  que experimentan las células de la raíz durante el estrés salino puede mejorar por la activación de SOS1 por el complejo SOS3-SOS2 y que SOS1 probablemente también recupera el  $\text{Na}^+$  a partir del xilema, por lo que evitan el exceso de este mineral en el tallo (Chinnusamy et. al., 2004).

Se han encontrado otros blancos de la vía SOS. Por ejemplo, en *Arabidopsis* la entrada de  $\text{Na}^+$  dentro de las células de la raíz durante el estrés salino ocurre mediada por AtHKT1, un transportador de  $\text{Na}^+$  de baja afinidad. La mutación *atkt1* suprime la mutación *sos3*, lo que sugiere que el complejo quinasa SOS3-SOS2 puede prevenir el influjo de  $\text{Na}^+$ , inactivando la proteína HKT1 o inhibiendo la expresión del gen HKT1 durante el estrés salino. Además la actividad del antiporter vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  pudiera ser activada por la vía SOS3-SOS2. Las evidencias disponibles sugieren que la vía SOS es específica para la homeostasis iónica bajo el estrés salino.

#### Vía de las CDPKs

La subfamilia CDPKs son proteínas monoméricas con una masa molecular de 40 a 90kDa. Las CDPKs constan de cinco dominios: un dominio N-terminal variable, el dominio quinasa, el dominio autoinhibitorio, el dominio autorregulatorio (semejante a la calmodulina) y un dominio C-terminal de longitud variable (Harmon, 2003).

Entre las 5 isoformas de CDPKs, los extremos N y C terminal son variables. Ninguna isoforma es una proteína integral de membrana, aunque un significativo porcentaje de las mismas, tienen sitios potenciales de miristoilación en el inicio de su dominio N terminal altamente variable, lo que se aso-

cia con la unión a la membrana de las CDPKs. Además se ha localizado la secuencia PEST en el extremo amino terminal de algunas CDPKs (la secuencia PEST es una región rica en prolina, glutamina, serina y treonina, la cual se encuentra en proteínas que sufrirán degradación proteolítica). El dominio quinasa conservado es típico de las serin-treonin quinasa y el lazo de activación (entre los subdominios VII y VIII) contiene residuos ácidos por lo que no es necesario fosforilar el lazo para activar la quinasa. Adyacente al dominio catalítico está el dominio autoinhibitorio que contiene una secuencia pseudosustrato que puede interactuar con el sitio activo e inhibir su actividad. El dominio regulatorio semejante a la calmodulina, que contiene 4 dominios *EF-hand* y es capaz de unir cuatro moles de  $\text{Ca}^{2+}$  por mol de enzima. El dominio C-terminal relativamente corto sigue al dominio regulatorio (Klimecka y Munszynska, 2007).

Las CDPKs pertenecen a una familia multigénica, por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* existen 34 genes para las CDPKs. En otras plantas también se ha detectado esta familia multigénica por ejemplo soya (*Glycine max*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), arroz (*Oryza sativa*) y maíz (*Zea mays*). Las isoformas de CDPKs de soya ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) difieren en sus patrones de expresión del ARN y en sus propiedades cinéticas y bioquímicas, incluyendo su capacidad para unir el calcio. Esto sostiene la hipótesis de que las CDPKs, a pesar de ser miembro de una sola familia, juegan diferentes papeles mediando las respuestas a varias señales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Klimecka y Munszynska, 2007).

Como se ha dicho anteriormente, en respuesta a la sequía y la salinidad, las plantas exhiben elevaciones del nivel de calcio citoplasmático descifrado por las CDPKs (Knigh y Knight, 2001). La elevación en los niveles transcripcionales, así como un incremento de la actividad de las CDPKs, se observó como

respuesta a diferentes estreses. En raíces y tallos de plántulas de arroz de 10 días, después del tratamiento con salinidad se incrementó el nivel de transcritos de OsCDPK. La sobreexpresión de OsCDPK en líneas transgénicas de arroz, permitió obtener plantas más tolerantes a la sequía y la salinidad, por tanto la OsCDPK parece jugar un papel importante en la tolerancia del arroz a diferentes tipos de estreses (Saijo *et al.*, 2000).

En hojas de tabaco el gen NtCDPK1, se regula transcripcionalmente por el NaCl y otros tipos de estrés. Los niveles de ARNm se incrementan después de 1-2 horas de tratamiento (Yoon *et al.*, 1999). Los transcritos de otra CDPK de tabaco, NtCDPK4, se indujeron por el tratamiento con NaCl. Los niveles máximos de transcritos después de 30 minutos de tratamiento con NaCl y retorno a los niveles basales en 2 horas (Zhang *et al.*, 2005). El análisis Northern Blot del ARN, aislado de plantas de *Arabidopsis*, indicó que el ARNm correspondiente al AtCDPK1 y AtCDPK2 se indujeron rápidamente inducidos por la sequía y por la salinidad, no así por las bajas o altas temperaturas. Estos hechos sugieren que un cambio en el potencial osmótico del ambiente dispara la inducción de AtCDPK y AtCDPK4 (Urao *et al.*, 1994). Un incremento en la actividad de una CDPK de 51 kDa se observó en plantas de arroz sometidas a estrés por salinidad, frío y sequía (Li y Komatsu, 2000).

Se han mostrado las funciones de las CDPKs en la transducción de la señal del ABA, pero se carece de evidencias genéticas moleculares que relacionen determinados genes que codifican para las CDPKs con las funciones biológicas a nivel de la planta completa. Zhu y colaboradores (2007) informaron que el ABA estimuló dos CDPKs homólogas en *Arabidopsis thaliana*, CPK4 y CPK11. Las mutaciones en estos genes condujeron a fenotipos insensibles al ABA en cuanto a la germinación de la semilla, el crecimiento de la



plántula, el movimiento estomático y disminución de la tolerancia al estrés salino. Las quinasas CPK4 y CPK11 fosforilan *in vitro* dos factores de transcripción activados por el ABA, ABF1 y ABF4, lo que sugiere que estas quinasas pudieran regular la señalización del ABA a través de estos FT.

#### Vía de las MAPKs

En plantas, las cascadas MAPK participan en la transducción de las señales de auxinas y citoquininas, se implican en la respuesta a las heridas y a los patógenos, así como en la transducción de señales de estrés ambiental (Xiong y Zhu, 2001). La vía MAPK se activa por receptores/sensores tales como proteínas tirosina quinasas, receptores acoplados a proteínas G y dos componentes tirosina quinasas, en respuesta al estrés osmótico y es responsable de la producción de osmolitos importantes en el ajuste osmótico y/o la respuesta a la detoxificación (Rodríguez *et al.*, 2005). Estas cascadas están altamente conservadas en eucariotas y constan de tres proteínas quinasas (Beckers *et al.*, 2009). El núcleo de las cascadas MAPK consiste en tres quinasas que se activan secuencialmente por una quinasa *upstream*. La MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK), después de su activación, fosforila la MAP quinasa quinasa (MAPKK) en residuos de treonina y serina (Ning *et al.*, 2008). Esta MAPKK, doblemente específica, fosforila en cambio a la MAP quinasa (MAPK) en residuos conservados de treonina y serina. La MAPK activada puede, tanto migrar al núcleo para activar los factores de transcripción directamente, o activar otros componentes de la señal para regular la expresión de genes, proteínas asociadas al citoesqueleto y actividades enzimáticas determinadas, o marcar ciertas proteínas marcadas para su degradación (Rodríguez *et al.*, 2005).

El genoma de *Arabidopsis* codifica aproximadamente 60 MAPKKKs, 10 MAPKKs y 20 MAPKs (Chisunnamy, 2004). Los miembros de la cascada MAPK se activan por más de un tipo de estrés, lo que sugiere que las cascadas MAPK actúan como punto de convergencia en la señalización del estrés abiótico. Se descubrió la cascada MAPK de *Arabidopsis* que consta de AtMEKK1, AtMEK1/AtMKK2 y AtMPK4. El estrés salino indujo la expresión y actividad de AtMEKK1 la cual activa la AtMPK4 *in vitro*. La AtMPK4 se activa por el frío, la sequía y el estrés osmótico. Aunque las entradas y salidas de la vía AtMPK4 AtMPK4 no se han definido, un análisis de microarreglo de *mpk1* indicó que los niveles de transcritos de un antiporter  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (AT4623700) se regula negativamente por la AtMPK1 (Chisunnamy, 2004).

En alfalfa una MAPK se activa después de diez minutos de tratamiento con frío, con sequía y estrés mecánico, pero no cuando son sometidas a calor, estrés salino o ABA exógeno (Jonak *et al.*, 1996), lo que sugiere que esta MAPK media la señalización del estrés por frío y por sequía, mediante una vía independiente de ABA.

Otros componentes de la cascada MAPK se han identificado en arroz, maíz, tabaco y tomate, en base a la conservación de su secuencia, aunque se plantea que sus funciones fisiológicas específicas en plantas son en su mayoría desconocidas (Ning *et al.*, 2008).

La NPK1 (*nicotiana protein kinase*) se encuentra de forma natural en tabaco y se activa en la presencia de peróxidos. Bajo condiciones de estrés abiótico, esta proteína quinasa inicia una cascada metabólica de MAPKs, que puede inducir la expresión de HSP (*heat shock protein*) (Assem *et al.*, 2009).

Tres MAPKs, (ANP1, ANP2, ANP3) en *Arabidopsis* comparten una gran similitud con el NPK1 de tabaco, el cual fue la primera MAPKKK aislada en plantas (Kovtun *et al.*,



2000). Se ha informado el papel de algunos miembros de la familia de genes de NPK1, en respuesta a estímulos ambientales en plantas. EL ANP1, que inicia una cascada de fosforilación de dos MAPKs del estrés, AtMPK3 y AtMPK6, participa en las vías de señalización del estrés oxidativo.

Krysan y colaboradores (2002) observaron que la activación de numerosos genes relacionados con el estrés en doble mutantes *anp2anp3*, lo que sugiere que el ANP en plantas silvestres funciona normalmente para regular la respuesta al estrés. Por otro lado, plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan el NPK1 muestran incrementos en su tolerancia a la salinidad.

Ning y colaboradores (2008) informaron la evolución, estructura y perfiles de expresión de 21 genes similares a NPK1 en el genoma de arroz. Especialmente interesante resultó que todos los genes en cluster se inducen por la sequía y la salinidad.

Las cascadas MAPK son importantes en la señalización de los ROS. Numerosos estudios muestran que las vías MAPK de señalización, no son solamente inducidos por los ROS sino también que regulan la producción de ROS. Particularmente MPK3 y MPK6 muestran efectos pleiotrópicos en varios procesos controlados por los ROS, particularmente la apertura estomática (Pitzschke y Hirt, 2009).

### Señalización mediada por fosfolípidos

La membrana plasmática percibe y transmite señales ambientales. El estrés osmótico conduce frecuentemente a alteraciones en la fluidez de la membrana y se sabe que los cambios en los fosfolípidos son eventos importantes que median las señales del estrés osmótico en plantas. La hipótesis más común es que los fosfolípidos son escindidos por fosfolipasas, las cuales producen

segundos mensajeros derivados de fosfolípidos (Munnik y Testerink, 2009). Los fosfolípidos de membrana constituyen un sistema dinámico que genera una multitud de moléculas señalizadoras tales como: inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), diacilglicerol (DAG), ácido fosfatídico (PA). En plantas, así como en otros organismos, se distinguen cuatro tipos de fosfolipasas en dependencia de su sitio de ruptura: fosfolipasa D (PLD), fosfolipasa C (PLC) y fosfolipasa A1 y A2 (PLA1 y PLA2). La señalización mediada por fosfolípidos puede ser regulada a través de proteínas G y puede estar relacionada con el calcio (Mahajan y Tuteja, 2005).

La fosfolipasa C (PLC) cataliza la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP3) en IP3 y DAG, los cuales actúan como segundos mensajeros. EL IP3 libera el calcio de los depósitos internos, a través de canales de calcio de unión a ligando, mientras que el DAG permanece en la membrana donde recluta y activa miembros de la familia de proteína quinasa C (Munnik y Testerink, 2009).

Numerosos estudios muestran en varias especies de plantas que los niveles de IP3 se incrementan rápidamente en respuesta al estrés osmótico (Dewald *et al.*, 2001). Los niveles de IP3 también se incrementaron después del tratamiento con ABA administrado de forma exógena en protoplastos de *Vicia faba* (Lee *et al.*, 1996) y en plántulas de *Arabidopsis* (Xiong *et al.*, 2001). Un gen de *Arabidopsis* que codifica para una PLC, *AtPLC*, se induce también por el estrés salino y la sequía. En células acompañantes, el IP3 indujo el incremento de calcio citoplasmático que condujo al cierre estomático y así a la retención del agua en la célula (Sanders *et al.*, 1999).

La fosfolipasa D cataliza la hidrólisis de fosfolípidos estructurales tales como la fosfatidilcolina. En el genoma de *Arabidopsis* existen 12 genes que codifican fosfolipasas D, mientras que en animales se encuentran

solo 2 y 1 en levadura. La familia fosfolipasa D en plantas se divide en 6 clases en dependencia de la homología en su secuencia y sus propiedades bioquímicas (Wang, 2005). Se ha sugerido que la fosfolipasa D participa en numerosos procesos tales como: transporte vesicular, degradación de membranas y señalización intracelular. Se ha informado que la fosfolipasa D participa en eventos de señalización que ocurren en respuesta a una multitud de estímulos: la congelación, las heridas, la interacción planta-patógeno, la deshidratación y el estrés salino (Bargmann y Munnik, 2006). Se cree que al ácido fosfatídico generado por la acción de la fosfolipasa D actúa como segundo mensajero en la señalización de estos eventos; donde se genera de forma rápida y transiente durante la respuesta al estrés y participa en las cascadas de señalización reclutando las proteínas hacia las membranas celulares y/o influenciando su actividad (Wang, 2005).

Se ha relacionado las foslipasa D con la salinidad y el estrés hiperosmótico en numerosos estudios. En suspensiones celulares de tomate tratadas con NaCl se incrementó la expresión del gen *LePLD  $\alpha$  1* (Laxalt *et al.*, 2001). También se indujo la expresión del gen *AtPLD  $\delta$* , mediante el tratamiento salino y por deshidratación en plantas de *Arabidopsis* (Mane *et al.*, 2007). La expresión "antisense" de *AtPLD  $\alpha$  1* en *Arabidopsis* condujo a un incremento en su sensibilidad al estrés por sequía (Mane *et al.*, 2007). Adicionalmente mutantes *knock-out pld\_3* son hipersensibles al estrés salino, así como al estrés hiperosmótico, mientras que las plantas que sobreexpresan este gen resultaron más resistentes a estos tipos de estreses (Hong *et al.*, 2008).

Bargmann y colaboradores (2009) examinaron la función del gen *PLD $\alpha$*  y  *$\delta$*  en la respuesta de suspensiones celulares de tomate y plantas a la salinidad así como el déficit hídrico. También emplearon simple y dobles mutantes de *Arabidopsis pld $\alpha$ 1* y *P.D.* De-

mostraron que ambas clases de fosfolipasa D se activan por diferentes tipos de estreses y que la carencia de estos genes en *Arabidopsis* disminuye la tolerancia a los medios salinos e hiperosmótico. De forma significativa los dobles mutantes son más sensibles que los mutantes simples.

La fosfolipasa A cataliza la hidrólisis de los fosfolípidos en lisofosfolípidos y ácidos grasos libres, tanto en la posición 1 del esqueleto del glicerol (PLA1) o en la posición 2 (PLA2) (Munnik y Testerink, 2009). Las plantas contienen numerosas PLA. En *Arabidopsis* se distinguen tres familias de fosfolipasas diferentes, aunque en su mayoría no está claro cuales son sus sustratos y cual posición hidrolizan; algunas exhiben actividades aciltransferasa o acilhidrolasa. Como tal, no está claro si sus efectos se reflejan en el metabolismo lipídico en general o en la señalización. No obstante se incrementan las evidencias de que las PLA están involucradas en la resistencia a enfermedades, las auxinas y la luz (Yang *et al.*, 2007). Por otro lado, se plantea que los lisofosfolípidos participan en la señalización celular. En particular la lisofosfatidilcolina, que se ha sugerido como activador de un antiporte vacuolar  $H^+/Na^+$ , que regula el pH citosólico en respuesta a elicitores patógenos (Viehweger, *et al.*, 2006).

### **Regulación de la expresión de genes por factores de transcripción**

Los diferentes genes de respuesta al estrés pueden ser categorizados en genes de inducción temprana y genes de inducción tardía. Los primeros son inducidos dentro de minutos de la percepción de la señal del estrés y con frecuencia se expresan de forma transiente. Varios factores de transcripción se incluyen entre este tipo de genes, pues su inducción no requiere la síntesis de nuevas proteínas. En contraste, la mayoría de los

genes activados por el estrés se activan lentamente y su expresión es frecuentemente sostenida (Mahajan y Tuteja, 2005).

Los FT se consideran esenciales para los patrones de expresión espacial y temporal de numerosos genes. Estas proteínas se caracterizan por su capacidad para unirse a secuencias reguladoras particulares en los genes que controlan para activar o desactivar su expresión. Poseen un motivo estructural característico, el dominio de unión al ADN, el que participa en el reconocimiento a una pequeña secuencia de ADN (usualmente entre 4-8 pb). En base a la estructura del dominio de unión al ADN, los FT en plantas, se clasifican entre 50 y 60 familias, y constituyen entre un 5 y un 7% de los genes que codifican proteínas (Gray, *et al.*, 2009). En el genoma de *Arabidopsis*, por ejemplo, alrededor del 5,9% codifica para más de 1500 FT. En este epígrafe se hace referencia a algunos FT que regulan la respuesta de la planta frente al estrés a la sequía la salinidad.

Se han identificado los principales regulones que se activan en respuesta al estrés abiótico en *Arabidopsis*. Por ejemplo, los DREB (*dehydration responsive element binding protein*) y CBF (*C-repeat binding factor*), funcionan en la expresión de los genes independientes de ABA. Mientras que los ABRE (*ABA-responsive element*) y ABF (*ABA binding factor*), funcionan de forma dependiente del ABA. Además de estas vías principales, otros regulones tales como el NAC y el MYB/MYC, participan en la expresión de los genes de respuesta al estrés abiótico. Numerosos estudios indican que los regulones DREB1/CBF, DREB2, AREB/ABF, y NAC tienen importantes funciones en la respuesta de la planta frente al estrés abiótico (Nakashima *et al.*, 2009).

El conocimiento de la regulación de los genes, es particularmente importante en el caso de rasgos multigénicos tales como la toleran-

cia a la sequía debido a que vías reguladoras diferentes determinan la expresión de un conjunto completo de genes. En genes regulados por el ABA y el estrés osmótico, uno o más ABREs (*ABA response elements*), juegan un importante papel en la actividad del promotor. Los ABREs tienen un núcleo ACGT. Las proteínas que se unen a estos ABREs contienen una región básica con motivos *zipper* de leucina. Los promotores ABREs y DRE (*dehydration response element*) juegan un importante papel en la regulación de la expresión de los genes en respuesta al estrés por sequía. El DRE también participa en la expresión de genes que responden a la salinidad y las bajas temperaturas.

Los factores de transcripción inducibles por el estrés incluyen miembros de la familia DREB (DRE binding protein), la familia ERF (*ethylene-responsive element binding factor*), la familia de "dedos de zinc", la familia bHLH (*basic helix-loop-helix*), la familia bZIP (*basic domain leucin zipper*) y la familia de los factores de transcripción "*homeodomain*". Estos factores de transcripción pudieran regular varios genes inducibles por el estrés, cooperativamente o de forma separada. El factor de transcripción DREB1A interactúa específicamente con el promotor DRE e induce la expresión de genes de tolerancia al estrés. La sobreexpresión del ADN complementario que codifica para DREB1A en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, activaron la expresión de genes de tolerancia al estrés bajo condiciones normales de crecimiento y resultó en una mejoría de la tolerancia a la sequía y la salinidad. El análisis funcional de estos factores de transcripción inducibles por el estrés proporciona más información acerca de la compleja red reguladora de genes involucrados en la respuesta a la sequía y la salinidad. El ABRE es el principal elemento que actúa en cis en la expresión de genes en respuesta al ABA. FT similares, DREB2A y DREB2B se activan por

el estrés osmótico y pueden inducir la expresión de genes en respuesta a este tipo de estrés. Las proteínas de unión a estos complejos de respuesta al ABA contienen dominios bZIP, por ejemplo, la EmBP1 de trigo, TAF1 de tabaco, OSBZ8 y OSZD1 de arroz. Algunos de estos TF son inducidos ellos mismos a niveles transcripcionales por el ABA o tratamiento de estrés.

Zhen y colaboradores (2009) caracterizaron funcionalmente el gen NAC, que codifica el factor de transcripción ONAC045, considerando su papel en la tolerancia al estrés abiótico. Los análisis de expresión revelaron que el ANAC045 se induce por la sequía y la salinidad y el tratamiento con ABA en hojas y raíces de plantas de arroz. Ensayos de activación transcripcional en levadura indicaron que el ONAC045 funciona como activador transcripcional. Plantas transgénicas de arroz que sobreexpresan el ONAC045 mostraron mayor tolerancia a la sequía y la salinidad. Estos resultados sugieren que este FT responde al estrés y pudiera ser un blanco de la ingeniería genética para obtener plantas tolerantes a la salinidad.

Se han informado algunos factores de transcripción tales como CBF1/DREB1B (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998), OsbZIP72 (Lu *et al.*, 2008) y AtMYB44 (Jung *et al.*, 2008), que están involucrados en la respuesta de la planta al estrés abiótico. Las plantas transgénicas que sobreexpresan estos genes pudieran incrementar su tolerancia a varios tipos de estrés abiótico (Zhang *et al.*, 2008).

El FT OsbZIP23 es un miembro de la familia de factores de transcripción bZIP y su expresión se induce fuertemente por condiciones abióticas estresantes tales como la salinidad y la sequía, así como por el ABA. Xiang y colaboradores (2009) obtuvieron que más de 30 genes son posibles blanco de este FT, por lo que plantean que es un FT de amplio espectro. Proponen, además que el OsbZIP23 es el

principal FT de esta familia en arroz y confiere tolerancia a la salinidad y la sequía.

Hasta la fecha se ha descrito varios genes *myb* que se activan en la planta como respuesta a la sequía. Por ejemplo en *Arabidopsis* se induce el FT *AtMYB2* por la deshidratación, y actúa como activador transcripcional de los genes que se inducen en la presencia del ABA durante la sequía. Además, el FT *BcMYB1* aislado de *Boea crassifolia* se induce fuertemente también por la sequía (Du *et al.*, 2009).

### Consideraciones finales

El conocimiento de las vías de transducción de señales en plantas es bastante limitado, en comparación con el existente sobre las vías de transducción de señales en animales y microorganismos.

Las plantas deben ser capaces de soportar un medio ambiente adverso, sin poder cambiar su hábitat como es el caso de los animales, es por ello que deben desarrollar mecanismos que le permitan percibir las variaciones en el medio, trasladar esa información al interior de sus células y elaborar una respuesta que le permita adaptarse. En este sentido, es necesario dirigir algunas investigaciones a la determinación de las estructuras que le permiten a las plantas detectar los cambios en el medio ambiente.

Numerosos estudios genéticos y moleculares han revelado que las vías de transducción de señales en plantas frente a la sequía y la salinidad, involucran numerosos componentes. La multiplicidad de información contenida en el estrés por sequía y por salinidad (entiéndase estrés osmótico, estrés oxidativo, toxicidad iónica) fundamenta la complejidad de la señalización de este fenómeno, pues la respuesta al mismo no es una vía lineal, sino un complejo circuito integra-

do que involucra múltiples rutas y compartimientos celulares específicos, tejidos y la interacción de moléculas señaladoras para coordinar una respuesta específica a un estímulo dado. Por ejemplo, se ha descrito la vía SOS que involucra una proteína de unión al calcio, que activa una quinasa, que a su vez es capaz de fosforilar determinadas proteínas involucradas en la respuesta al estrés por salinidad y sequía, específicamente para restablecer la homeostasis iónica. Hasta la fecha se han descrito algunas, pero pueden existir otras cuya existencia y posible función se desconocen y sería importante continuar las investigaciones en este sentido.

Asimismo, sería útil profundizar en el conocimiento acerca de los diferentes componentes de la cascada MAPK y sus funciones específicas en la tolerancia de las plantas a la salinidad y la sequía.

Además la tolerancia a la sequía y la salinidad son rasgos multigénicos, por lo que su regulación genética resulta en extremo compleja. Se han caracterizado un gran número de factores de transcripción, pero el conocimiento de su interacción con otras moléculas dentro de la vía de señalización es, en su mayoría, escaso. Por tanto, se debe continuar profundizando el conocimiento acerca de los factores de transcripción que regulan la expresión de los genes de respuesta al estrés, así como su interacción con promotores, con enzimas (ARN polimerasa y otras) y con otros factores de transcripción.

Otras líneas de investigación en este campo involucran el estudio de la interconexión de estas vías de señalización, así como su relación con las vías de respuesta a otros tipos de estrés abiótico y biótico. También sería interesante conocer cómo están dispuestos en la membrana celular los componentes de las vías de transducción de señales que se asocian a esta estructura, ¿se agregan cuando se percibe la señal del estrés, o forman

empaquetamientos en la membrana que le permiten una interacción más eficiente? Sin dudas son muchas las interrogantes y los retos, que con los nuevos adelantos de la proteómica funcional y la metabolómica, se irán solucionando en el futuro.

## Bibliografía

- Bargmann BOR, Laxalt AM, Riet B, Schooten B, Merquiol E, Testerink C, Haring MA, Bartels D y Munnik T, 2009. Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants. *Plant Cell Physiol.* 50(1): 78-89.
- Bartels D, Sunkar R, 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24: 23-58.
- Beckers G, Jaskiewicz M, Liu Y, Underwood WR, He SY, Zhang S, Conrath U, 2009. Mitogen-Activated Protein Kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell.* 21: 944-953.
- Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu J, 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sci.* 45, 437-448.
- Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK, 2004. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J. Exp. Bot.*, 55: 225-236.
- De Wald DB, Torabinejad J, Jones CA, Shope JC, Cangelosi AR, 2001. Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 759-769.
- Du H, Zhang L, Liu L, Tang X, Yang W, Wu Y, Huang Y, Tang Y, 2009. Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry.* 74 (1): 5-16.
- Gray J, Bevan M, Brutnell T, 2009. A recommendation for naming transcription factor proteins in the grasses. *Plant Physiology.* 149: 4-6.



- Hussain TM, Chandrasekhar T, Hazara M, Sultan Z, Saleb BK, Gopal GR, 2008. *Biotech. Mol. Biol. Rev.* 3 (1): 8-13.
- Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O, Thomashow MF, 1998. *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280: 104-106.
- Jung C, Seo JS, Han SW, Koo YJ, Kim CH, Song SI, Nahm BH, Choi YD, Cheong JJ, 2008. Overexpression of AtMYB44 enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 146: 623-635.
- Klimecka M, Muszynska G, 2007. Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. *Acta Biochimica.* 54(2):219-233.
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J, 2000. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:2940-2945.
- Krysan PJ, Jester PJ, Gottwald JR, Sussman MR, 2002. An *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase kinase gene family encodes essential positive regulators of cytokinesis. *Plant Cell.* 14:1109-1120.
- Lee Y, Choi YB, Suh J, Lee J, Assmann SM, 1996. Abscisic acid induced phosphoinositide turnover in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Plant Physiol.* 110: 987-996.
- Lorenzo L, Merchan F, Laporte P, Thompson R, Clarke J, Sousa C, Crespi M, 2009. A novel plant leucine-rich repeat receptor kinase regulates the response of *Medicago truncatula* roots to salt stress. *The Plant Cell.* 21:668-680.
- Lu G, Gao C, Zheng X, Han B, 2008. Identification of OsbZIP72 as a positive regulator of ABA response and drought tolerance in rice. *Planta* [Epub ahead of print].
- Maathuis FJM, Amtmann A, 1999. K<sup>+</sup> nutrition and Na<sup>+</sup> toxicity: the basis of cellular K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratios. *Annals of Botany.* 84: 123-133.
- Mahajan S, Tuteja N, 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 444 139-158.
- Marschner H, 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants.* Second Edition. Academic Press Ltd., London.
- Munnik T, Testerink C, 2009. Plant phospholipid signaling: "in a nutshell". *Journal of Lipid Research.* 50:S260-S265.
- Munns R, Tester M, Mechanisms of Salinity Tolerance. 2008. *Annual Review of Plant Biology.* 59: 651-681.
- Murata Y, Katsura S, Obi I, Kakutani T, 2000. Alterations in Ca<sup>2+</sup>-binding on plasma membrane after adaptation to salt stress of tobacco cells in suspension. *Plant and Cell Physiology.* 41: 1286-1292.
- Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K, 2009. Transcriptional Regulatory Networks in Response to Abiotic Stresses in *Arabidopsis* and Grasses. *Plant Physiology.* 149: 88-95.
- Ning J, Liu S, Hu H, Xiong L, 2008. Systematic analysis of *NPK1*-like genes in rice reveals a stress-inducible gene cluster co-localized with a quantitative trait locus of drought resistance. *Mol Genet Genomics.* DOI 10.1007/s00438-008-0385-7.
- Pitzschke A, Hirt H, 2009. Disentangling the Complexity of Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species Signaling. *Plant Physiology.* 149: 606-615.
- Sanders D, Brownlee C, Harper JF, 1999. Communicating with calcium. *Plant Cell.* 11: 691-706.
- Shireen K, Assem Ebtissam HA, Hussein Hashem A, Hussein Basry M, 2009. Genetic transformation of the *Nicotiana* Protein Kinase (NPK1) gene confers osmotic tolerance in Egyptian maize. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences.* 3(2): 828-835.
- Viehweger K, Schwartze W, Schumann B, Lein W, Roos W, 2006. The Galpha protein controls a pH-dependent signal path to the induction of phytoalexin biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *Plant. Cell.* 18: 1510-1523.
- Vijayan K, 2009. Approaches for enhancing salt tolerance in mulberry (*Morus* L). A review. *Plant Omics Journal.* 2(1):41-59.

- Xiang Y, Tang N, Du H, Ye H, Xiong L, 2008. Characterization of OsbZIP23 as a key player of bZIP transcription factor family for conferring ABA sensitivity and salinity and drought tolerance in rice. *Plant Physiology Preview*. DOI: 10.1104/pp.108.128199.
- Xiong L, Zhu JK, 2001. Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives. *Physiol. Plant*. 112: 152-166.
- Xiong L, Ishitani M, Lee H, Zhu JK, 2001. The *Arabidopsis* *LOS5/ABA3* locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell* 13: 2063-2083.
- Yang W, Devaiah SP, Pan X, Isaac G, Welti R, Wang X, 2007. AtPLAI is an acyl hydrolase involved in basal jasmonic acid production and *Arabidopsis* resistance to *Botrytis cinerea*. *J. Biol. Chem.* 282: 18116-18128.
- Zhang Y, Li Y, Gao T, Zhu H, 2008. *Arabidopsis* SDI1R1 enhances drought tolerance in crop plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72(8): 2251-2254.
- Zheng X, Che B, Lu G, Han B, 2009. Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379: 985-989.
- Zhou S, Wei S, Boone B, Levy S, 2007. Microarray analysis of genes affected by salt stress in tomato. *African Journal of Environmental Science and Technology*. Vol. 1 (2): 014-026.
- Zhu SY, Yu XC, Wang XJ, Zhao R, Li Y, Fan RC, Shang Y, Du SY, 2007. Two Calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate Abscisic Acid signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 19:3019-3036.

(Aceptado para publicación el 3 de junio de 2010)



## Efecto de la fertilización química y organomineral sobre la producción de canola en seco bajo labranza reducida en Michoacán, México

B.L. Gómez y M.A. Cepeda

INIFAP C.E. Uruapan. Avda. Latinoamericana N° 1101. Col. Revolución. C.P. 60500 Uruapan, Michoacán, México. E-mail: blucatero@prodigy.net.mx

### Resumen

En el 2006 se estableció un experimento de canola con el híbrido Hyola 401 en la región centro occidente de México, donde se evaluaron bajo labranza reducida 10 tratamientos derivados de la combinación de dos fertilizantes organominerales: Silifertidol Plus y Fosfosilidol, con las formulas de fertilización 120-60-80 y 90-45-60 de nitrógeno, fósforo y potasio, respectivamente, así como cada uno de ellos, un testigo absoluto y el testigo regional bajo labranza convencional (120-60-80). Se estudiaron las variables índice de área foliar, altura de planta, densidad de plantas, silicuas por planta, granos por silicua, peso de mil granos y rendimiento de grano. Los resultados indicaron alta significancia en la mayoría de las variables estudiadas. Las variables que mostraron influencia positiva con la aplicación del fertilizante químico + organomineral fueron el índice de área foliar, número de silicuas por planta y peso de mil granos, con incrementos hasta del 109, 126 y 10%, respectivamente; sobre el testigo bajo labranza convencional además estas variables fueron las que presentaron un efecto directo sobre el rendimiento de grano. Con la fertilización organomineral bajo labranza reducida es posible disminuir la fertilización química en un 25%, con un incremento en rendimiento de grano de 702 kg ha<sup>-1</sup> sobre el testigo regional bajo labranza convencional.

**Palabras clave:** *Brassica napus*, silicio, rendimiento.

### Summary

**Effect of the chemical and organomineral fertilization on the production of canola in dry land under tillage reduced in Michoacán, Mexico**

In the 2006 an experiment of canola was established with the hybrid Hyola 401 in the region central western Mexico, where 10 treatments derived from the combination of two fertilizer organic-minerals: Silifertidol plus and Fosfosilidol were evaluated under reduced tillage, with fertilization 120-60-80 and 90-45-60 of nitrogen, phosphorus and potassium, respectively, and as well as each of them, an absolute witness and the regional witness under conventional tillage (120-60-80). Leaf area index, height of plant, plant density, pods by plant, grains by pod, weight of thousand grains and grain yield were evaluated. The results indicated high significance in the majority of the studied variables. The variables that showed positive influence to the application of chemical fertilizer + organic-mineral fertilizer were the leaf area index, number of pods by plant and weight of thousand grains, with increases until of the 109, 126 and 10%, respectively; on the witness under conventional tillage in addition these variables were those that presented a direct influence on the grain yield. With the organo-mineral fertilization under reduced tillage it is possible to diminish the chemical fertilization in a 25%, with an increase in grain yield of 702 kg ha<sup>-1</sup> on the regional witness under conventional tillage.

**Key words:** *Brassica napus*, silicon, yield.

## Introducción

México es un país con graves problemas de erosión; 80% de su territorio muestra algún grado de erosión y en el 42% de los suelos se ha perdido de 25% a 75% de su capa superficial (Anaya, 1989). Las características topográficas y la intensidad de las lluvias que predominan en el país caracterizan un alto riesgo de erosión (Zuñiga *et al.*, 1993), especialmente en terrenos de ladera donde se pierden  $2,87 \text{ t ha}^{-1}$  al año. Turrent (1986), estimó que el 61% del área dedicada a cultivos anuales en el país se encuentra en pendientes mayores a 4%. La pérdida de suelo existe en todos los estados de la República Mexicana, donde Tlaxcala ocupa el primer lugar con una pérdida de suelo del 74%, mientras que Baja California Sur se encuentra en el último lugar con el 4,5%; Michoacán esta en el puesto 13 con una pérdida del 55% (Ramos, 2007).

En el centro noreste del estado de Michoacán se ubica la Meseta Purhépecha, constituida por 17 municipios entre los que se encuentra Nahuatzen y abarca una superficie de 481 711 has, la cual, representa el 8% de la superficie estatal. En las partes altas (hasta 3340 msnm) el clima es semifrío subhúmedo y en las partes bajas (1800 msnm) el clima es húmedo y subhúmedo, con una precipitación que va desde 1000 a 1500 mm anuales y un rango de temperaturas media de  $12^\circ \text{ C}$  a  $18^\circ \text{ C}$  (Astier, 2007).

En la Meseta Purhépecha, el 91% de los ejidos y comunidades se dedica a la agricultura de temporal y el sistema que se practica en el 80% de la superficie es el de "año y vez", en el "año" con monocultivo de maíz y en el "vez" permanece en descanso. En esta región el deterioro ecológico provocado por la agricultura tiene diversas causas: 1) manejo inadecuado de los recursos naturales: bosques degradados e incendios forestales (Lemus, 2007); 2) utilización de

labranza convencional en parcelas con pendientes del 4 al 16% (Astier, 2007), lo que ha ocasionado una erosión hídrica entre el 62 y 71%; 3) los dos aspectos anteriores han influido en la pérdida de la biodiversidad. Aunado a lo anterior, los suelos son andosoles, con pH ácido ( $\text{pH} \leq 6.0$ ) y su principal limitante química es la capacidad para fijar el fósforo en la superficie de los minerales amorfos. Los mecanismos de fijación de fósforo en la alófana e imogolita incluyen procesos como quimiadsorción, desplazamiento de silicio estructural y precipitación. La fracción humus forma fácilmente complejos con metales como el aluminio. El carbono atrapado en estos complejos es inactivo y deja de ser parte del carbono activo de la fracción orgánica. Por otro lado los grupos hidroxilo combinados con el aluminio entran en reacciones de intercambio con  $\text{HPO}_4^-$  y  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , fijando fuertemente el fósforo aplicado (Espinoza, 2004). La suma de todos estos factores limitan la producción de los cultivos, sobre todo del maíz, obteniéndose un rendimiento medio de  $1800 \text{ kg ha}^{-1}$ , el cual no garantiza la satisfacción de las necesidades económicas del productor y su familia (Tapia *et al.*, 2002).

El uso agrícola intensivo del suelo, ha provocado también el desequilibrio de nutrientes contenidos en el suelo, dado que una parte significativa es removida por la producción de grano, el desarrollo vegetativo del cultivo y de la maleza, la lixiviación y la erosión eólica e hídrica. Cuando un suelo ya está degradado, la práctica del encalado puede resultar contraproducente, ya que causa un mayor proceso de degradación, cuando se adiciona de manera irracional el catión ( $\text{Ca}_2^+$ ), se liberan protones ( $\text{H}^+$ ), que proporcionan un suelo ácido y se libera también silicio amorfo insoluble. Para mantener la productividad y sustentabilidad de los sistemas agrícolas es importante comprender también el papel del silicio en el suelo y en el cultivo (Quero, 2006b).

En los últimos años, la labranza de conservación y el uso de fertilizantes de origen orgánico, se han promovido como una alternativa viable para contribuir a revertir la degradación de los recursos naturales (Roberts, 2002) y al cultivo de canola para ayudar a incrementar la biodiversidad. Estas actividades agrícolas se lograrán con un manejo apropiado de suelos, cultivo, nutrimentos, humedad y biomasa microbiana, tendientes a fomentar el desarrollo de una agricultura sostenible en la región (Bocco *et al.*, 2000).

La implementación de prácticas como la labranza de conservación y el manejo balanceado de la fertilidad del suelo, juegan un papel muy positivo al secuestrar carbono de la atmósfera en los cultivos para luego retenerlo en el suelo. Los resultados experimentales han mostrado las ventajas significativas de la labranza de conservación sobre la labranza convencional. Bajo condiciones de ladera y andosoles se encontró en los primeros años diferencias de 400% mayor erosión en labranza convencional comparada con labranza de conservación (Tiscareño *et al.*, 1997). En la cuenca hidrográfica de Pátzcuaro, Michoacán se midió una pérdida de nitrógeno por ciclo en el cultivo de maíz 2,5 más alta con labranza convencional que con labranza de conservación (Velásquez *et al.*, 1997). Más de cien experimentos, efectuados en el programa nacional durante cinco años, mostraron que la labranza de conservación reduce la tasa de erosión en aproximadamente 80% en el maíz y 95% en el caso de trigo comparado con labranza convencional. A medida que se continúa aplicando la labranza de conservación, la tendencia es aumentar aún más la protección del suelo (Osuna, 1997; Velásquez *et al.*, 1997).

Por otro lado, una fertilización balanceada incrementa la eficiencia del uso de nutrientes y por esta razón, existe menor probabilidad de que los nutrientes se pierdan al ambiente por lixiviación o escorrentía superficial. Sin

embargo, la fertilización es un producto con bajo margen de ganancia para los productores; además, su adquisición se limita por los altos costo y esto trae como consecuencia aplicaciones de dosis inadecuadas; lo que implica menor rendimiento y menor ganancia (Olar-te-Ortiz *et al.*, 2000). Entre los elementos nutricionales de origen mineral para las plantas se distinguen dos tipos: los macronutrientes y los micronutrientes. Aunque el silicio es un componente cuantitativo importante de las plantas superiores, este elemento no está considerado en forma general como esencial para ellas. Por lo tanto, no se incluye en cualquier formulación de solución ampliamente utilizada en los cultivos.

El silicio es el segundo elemento más abundante en la tierra con un 27,7%, después del oxígeno y es también abundante en la mayoría de los suelos (Datnoff *et al.*, 1997). En la naturaleza se encuentran formas biogeoquímicas activas de silicio como: monómeros, ortosilícico,  $H_4SiO_4$  y metasilícico,  $H_2SiO_3$ , dímeros, trímeros, polímeros, coloides, agregados coloidales y el silicio amorfo. Adicionalmente, con la acción de agentes abióticos, temperatura, lluvia y el  $CO_2$  disuelto en el agua en la forma de ácido carbónico ( $H_2CO_3/CO_2$ ), actúan sobre los minerales arcillosos y liberan el ácido silícico a una concentración de 1 a 50  $mg\ kg^{-1}$ , al mismo tiempo liberan elementos minerales, formándose silicatos de calcio, magnesio, potasio, zinc, hierro, incrementando grandemente la capacidad de intercambio catiónico de los suelos y el pH del suelo se torna básico. En estas condiciones de pH y capacidad de intercambio catiónico los suelos son altamente productivos (Quero, 2006a).

El silicio aunque no se le considera un nutriente esencial, es removido anualmente por los cultivos en cantidades de 200 a 500  $kg\ ha^{-1}$  y es utilizado por las plantas para transportar en sus tejidos, minerales y compuestos orgánicos como los azúcares, así

mismo para formar estructuras, poliméricas y cristalinas en la cutícula de las hojas, que permiten resistir estrés biótico y abiótico. Estructuras ricas en silicio que forman parte de las hojas son: fitolitos, tricomas y cadenas poliméricas presentes en las paredes celulares. Los tricomas son importantes para la liberación de compuestos con actividad fungicida e insecticida (Quero, 2006c). Por lo anterior, Marschner (1995) y Quero (2006b), menciona que este elemento controla el desarrollo del sistema radicular, la asimilación y distribución de nutrientes minerales, incrementa la resistencia de la planta al estrés abiótico (alta y baja temperatura, viento, alta concentración de sales, metales pesados y aluminio) y biótico (insectos, hongos, enfermedades).

Los niveles de silicio en el suelo se mejoran con la aplicación de compostas (ganaderas), ya que aportan de 40 a 60 kg·t de silicio, además de nitrógeno, potasio y carbono; con la aplicación de fertilizantes minerales de nueva generación como el Silifertidol y Fosfosilidol se aporta de 90 a 150 kilos de silicio por tonelada de producto, lo que supera al 4% de silicio que contienen los esquilmos agrícolas (Quero, 2006b). El Silifertidol es un fertilizante mineral compuesto por carbonato de calcio, carbonato de magnesio y bióxido de silicio; mientras que, el Fosfosilidol, además de estos compuestos contiene fósforo. Estos fertilizantes por su origen natural y dado que no son productos desarrollados químicamente son aceptados como fertilizantes orgánicos (DAMSA, 2006). Estas técnicas agrícolas apoyan la activación y degradación de las arcillas liberando silicio en la forma de ácido ortosilícico ( $H_4SiO_4$ ), manteniendo una concentración entre 20 y 40 ppm en la zona radicular, a lo largo del desarrollo del cultivo. El ácido ortosilícico será asimilado por la planta a través del sistema radicular, para satisfacer las demandas del cultivo, que en promedio son similares a las de potasio y nitrógeno, para los cultivos de arroz, caña de azúcar y papa (Quero, 2006b).

En consideración a lo anterior, los objetivos del trabajo fueron: a) Seleccionar el tratamiento de fertilizante químico y organomineral bajo labranza reducida con mejor respuesta al rendimiento de grano; b) disminuir los costos de producción e incrementar la rentabilidad del cultivo al reducir los fertilizantes químicos y c) evaluar el efecto del fertilizante químico y organomineral bajo labranza reducida sobre las propiedades químicas del suelo.

## Materiales y Métodos

El trabajo se estableció en Nahuatzen, Michoacán, México, durante el ciclo primavera-verano 2006. El sitio se ubicó entre los 19° 38' N y 101° 55' O, con una altura sobre el nivel del mar de 2388 m; el clima es templado húmedo y un suelo franco arenoso con un pH ligeramente ácido de 6,0 (Figura 1).

La siembra se realizó con el híbrido de canola "Hyola 401" el 22 de junio de 2006 bajo labranza reducida (rastreo-surcado-escarda) con la sembradora Dobladense modelo OL-U2N a una densidad de 3,5 kg ha<sup>-1</sup>. La semilla fue tratada con Carbofuradan 300TS (400 ml/3,5 kg semilla) para evitar el daño de la plaga del suelo (Familia Carabidae). Se utilizaron dos fuentes de silicio el Silifertidol Plus y el Fosfosilidos, la composición de ellos se muestra en la Tabla 1 y el total de los tratamientos evaluados se presentan en la Tabla 2. El control de malezas se realizó a los 27 días después de la siembra con la aplicación de Paraquat (2,0 L ha<sup>-1</sup>) en forma dirigida, ya que es un herbicida total de contacto y Sethoxydim (1,5 L ha<sup>-1</sup>) que es sistémico y selectivo para hoja angosta, en forma total ya que no afecta al cultivo. La cosecha se realizó el 29 de noviembre de 2006.

El diseño experimental fue de bloques completos al azar con cuatro repeticiones; la

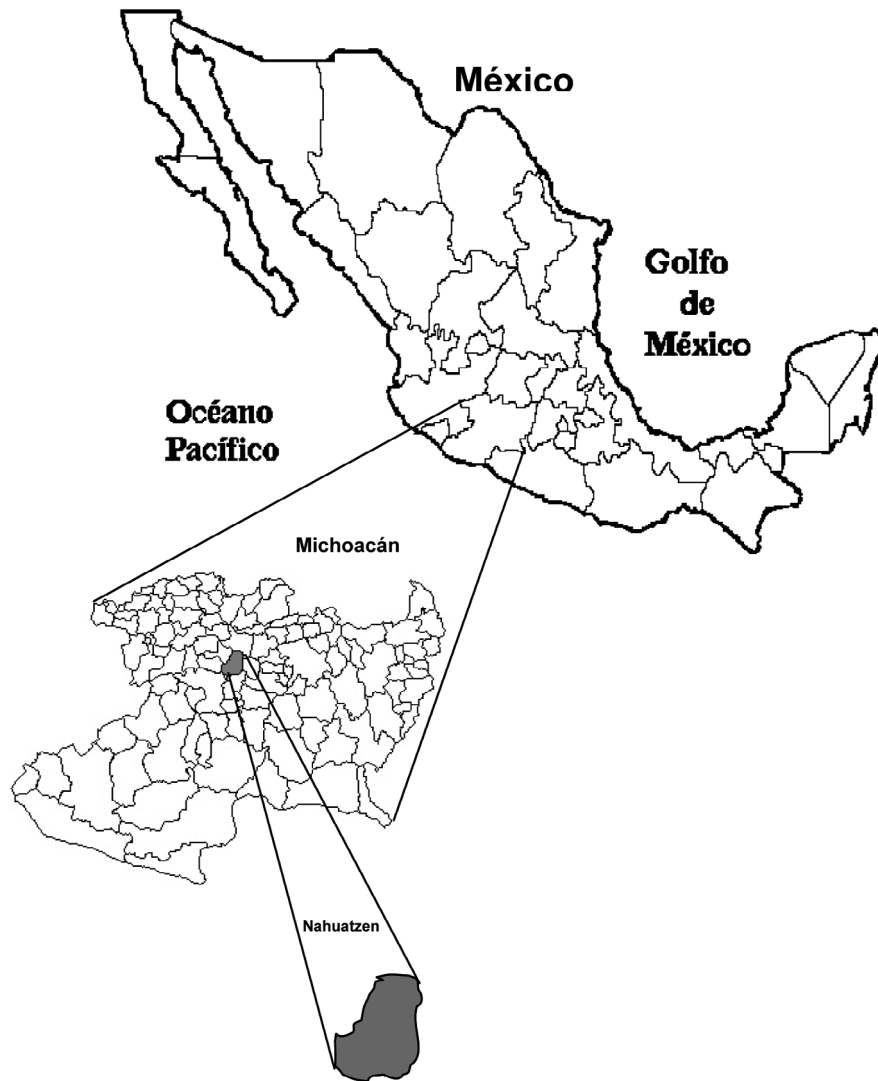


Figura 1. Ubicación del municipio de Nahuatzen en el estado de Michoacán, México.  
 Figure 1. Location of the municipality of Nahuatzen in the state of Michoacan, Mexico.

parcela experimental estuvo formada de cuatro surcos de 5,0 m de largo y 0,80 m de ancho, como parcela útil se cosecharon los dos surcos centrales.

Se tomaron datos climáticos diarios (temperatura máxima, mínima y precipitación) durante el ciclo fenológico del cultivo (22 de junio

al 29 de noviembre de 2006). Las variables evaluadas fueron: índice de área foliar (se determinó con el equipo Ceptómetro Accu-Par, modelo PAR-80), altura de planta, densidad de plantas en  $8\text{ m}^{-1}$ , número de silicuas por planta, número de granos por silicua, peso de mil granos y rendimiento de grano.

Antes de la siembra, en el terreno donde se estableció el experimento, se tomaron 6 muestras de suelo en zig zag a una profundidad de 0-25 cm y se formó una muestra compuesta, la cual se envió al laboratorio para su análisis físico-químico. Al final del ciclo se tomó una muestra por cada tratamiento y repetición a profundidad de 0-25 cm y se generó una muestra compuesta por tratamiento, la cual se envió al laboratorio para analizar las características químicas del sue-

lo mediante la técnica de espectroscopia de energía dispersiva de rayos X, con la microsonda inca<sub>x</sub>-sight modelo 7373, acoplada a microscopio electrónico de barrido.

Se realizó un análisis de varianza y las diferencias de los tratamientos se evaluaron al 5% a través de la comparación de medias de Tukey (Steel y Torrie, 1980). Además se efectuó un análisis económico para determinar la relación beneficio costo de cada uno los tratamientos.

Tabla 1. Composición química de los dos fertilizantes organominerales evaluados en canola de secano. Nahuatzen, Michoacán, México, 2006  
*Table 1. Chemical composition of the two fertilizers organomineral evaluated in canola dry land. Nahuatzen, Michoacan, Mexico, 2006*

| Elemento | Cantidad (%)     |              |
|----------|------------------|--------------|
|          | Siliferidol Plus | Fosfosilidol |
| Silicio  | 24               | 31,0         |
| Calcio   | 23               | 10,0         |
| Magnesio | 12               | 2,0          |
| Hierro   | 5                | 1,8          |
| Zinc     | 5                | 3,6          |
| Potasio  | 2                | 2,5          |
| Fósforo  |                  | 9,0          |

Tabla 2. Tratamientos de fertilización evaluados en canola  
*Table 2. Fertilization treatments evaluated in canola*

| No. Tratamiento | Fertilización Orgánica | Dosis (kg ha <sup>-1</sup> ) | Fertilización Química (NPK) |
|-----------------|------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 1               | Silifertidol Plus      | 500                          | 120-60-80                   |
| 2               | Silifertidol Plus      | 500                          | 90-45-60                    |
| 3               | Silifertidol Plus      | 500                          |                             |
| 4               | Fosfosilidol           | 250                          | 120-60-80                   |
| 5               | Fosfosilidol           | 250                          | 90-45-60                    |
| 6               | Fosfosilidol           | 250                          |                             |
| 7               |                        |                              | 120-60-80                   |
| 8               |                        |                              | 90-45-60                    |
| 9               | Testigo regional       |                              | 120-60-80 <sup>(1)</sup>    |
| 10              | Testigo absoluto       |                              |                             |

<sup>(1)</sup> Labranza convencional (barbecho-rastreo-surcado-escarda).



## Resultados y Discusión

El análisis físico-químico inicial indicó una textura franco-arenosa, con un pH moderadamente ácido (6,07), materia orgánica alta (2,97%), nitrógeno (8,21 ppm), y fósforo (2,31 ppm) muy bajos, potasio muy alto (701 ppm) y mediano calcio (2117 ppm).

En la Figura 2, se muestra la distribución de lluvias y temperaturas prevalecientes durante el desarrollo fenológico del cultivo de canola en el ciclo primavera-verano 2006. De acuerdo a los requerimientos climáticos, la canola necesita temperaturas entre 5 y 30 °C, ideales entre 20 y 22 °C (Thomas, 2003); en éste aspecto el desarrollo de la canola se vio favorecido, ya que desde el período vegetativo hasta el de maduración (160 días), las temperaturas máximas oscilaron

entre 21 y 26 °C, de finales de junio a noviembre, mientras que, las mínimas fluctuaron entre 8 y 14 °C; no se presentaron temperaturas superiores de 30 °C y las inferiores o iguales a 0 °C sucedieron del 22 al 26 de noviembre, casi para la cosecha, por lo tanto, ya no tuvieron efecto sobre el cultivo. Lo que causó una disminución del 5% en el rendimiento de grano, fue la tormenta con granizo ocurrida el 16 de agosto.

La precipitación acumulada en esta región fue de 1187 mm, con una distribución uniforme, lo que indica que el cultivo tuvo suficiente agua durante todos sus estados fenológicos. El requerimiento de agua en canola para su mejor rendimiento depende de la variedad, manejo del cultivo y el ambiente; su consumo puede variar entre los 450 a 550 mm durante su desarrollo. Nielsen (1996)

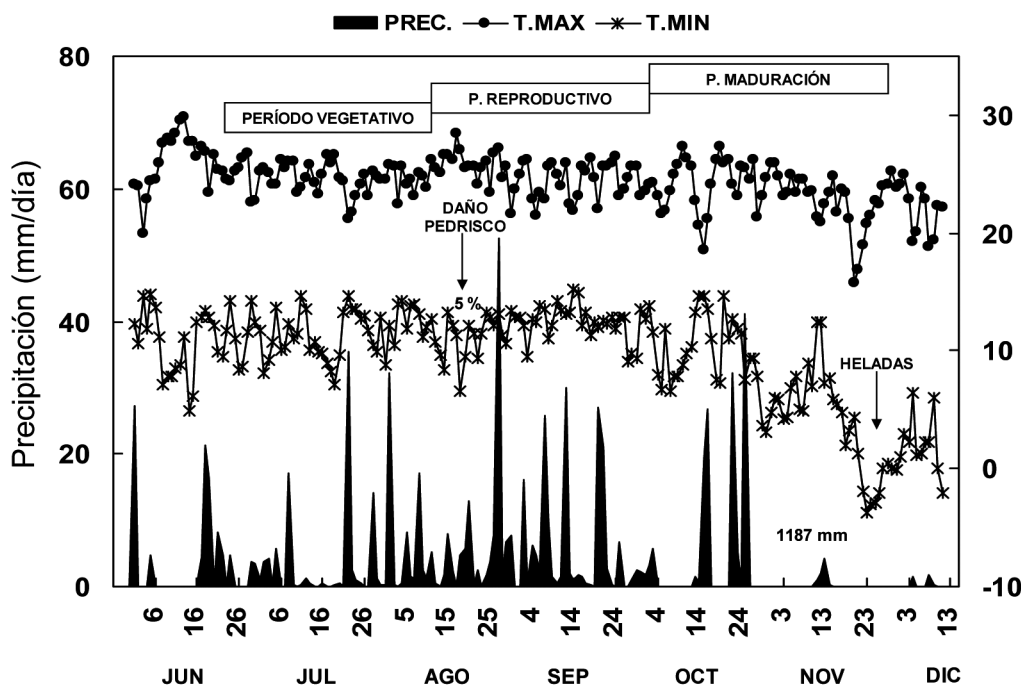


Figura 2. Condiciones climáticas prevalecientes en Nahuatzen, Mich., México. 2006.  
 Figure 2. Climatic conditions prevailing in Nahuatzen, Mich., Mexico. 2006.



mostró rendimientos de 538 y 3416 kg ha<sup>-1</sup> al consumir 249 mm y 521 mm de agua respectivamente.

En la Tabla 3, se muestran los valores medios para el índice de área foliar, altura de planta y densidad de plantas, observándose diferencias significativas para el índice de área foliar y altura de planta con coeficientes de variación aceptables entre el 6 y 28%. En el índice de área foliar el tratamiento 1, fue el mejor con un incremento del 108% sobre el testigo regional, seguido por el tratamiento 4, 5 y 8 con ganancias del 57, 52 y 43%, respectivamente sobre el testigo regional. En altura de planta, la mayor correspondió al testigo regional con 141 cm, con un incremento entre el 13 y 32% sobre todos los tratamientos. En la densidad de plantas

no hubo diferencias significativas, el testigo regional obtuvo 90 plantas en 8 m<sup>-1</sup> y solamente fue superado por los tratamientos 5 y 7, los cuales mostraron ganancias de 15 y 5 plantas, respectivamente; la densidad de plantas no es un factor que interfiera en el rendimiento de grano, debido a la plasticidad del cultivo; la reducción de 80 a 40 plantas por m<sup>-1</sup> no afecta el rendimiento, siempre que la población se distribuya de forma uniforme (Angadi *et al.*, 2003).

Esto resultados coincide parcialmente con lo reportado por Carrillo (2005), ya que al aplicar silicato de potasio en canola con una fertilización química de 100-80-00 (nitrógeno, fósforo y potasio), incrementó en 7% la biomasa aérea y en 17% la densidad de plantas, mientras que la altura de planta disminuyó en 8%.

Tabla 3. Comparación de medias para el índice de área foliar, altura de planta y densidad de población para los tratamientos evaluados en canola. Nahuatzen, Mich., 2006  
Table 3. Comparison of means for the leaf area index, height of plant and plant density for the evaluated treatments in canola. Nahuatzen, Mich., 2006

| No. Tratamiento           | Fertilización  |                  | Índice de Área foliar | Altura Planta (cm) | Densidad de plantas (8 m <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------|----------------|------------------|-----------------------|--------------------|--|
|                           | Organo-mineral | Química          |                       |                    |  |
| 1                         | SP             | 120-60-80        | 3,67 a                | 123 b              | 79                                       |
| 2                         | SP             | 90-45-60         | 2,20 bc               | 117 bc             | 81                                       |
| 3                         | SP             |                  | 0,89 d                | 103 cd             | 81                                       |
| 4                         | FS             | 120-60-80        | 2,77 b                | 123 b              | 89                                       |
| 5                         | FS             | 90-45-60         | 2,52 b                | 118 bc             | 105                                      |
| 6                         | FS             |                  | 0,93 d                | 96 d               | 87                                       |
| 7                         |                | 120-60-80        | 2,33 bc               | 118 bc             | 95                                       |
| 8                         |                | 90-45-60         | 2,68 b                | 118 bc             | 74                                       |
| <b>9</b>                  | <b>TR</b>      | <b>120-60-80</b> | <b>1,76 c</b>         | <b>141 a</b>       | <b>90</b>                                |
| 10                        | TA             |                  | 0,58 d                | 88 d               | 77                                       |
| Media general             |                |                  | 2,03                  | 114                | 85                                       |
| Coeficiente Variación (%) |                |                  | 13                    | 6                  | 28                                       |
| Significancia             |                |                  | **                    | **                 | ns                                       |

SP = Silifertidol Plus, FS = Fosfosilidol, TR = Testigo regional (labranza convencional), TA = Testigo Absoluto.

En estos resultados, se observa que los tratamientos con mayor altura, no fueron los que obtuvieron los valores más altos de índice de área foliar, sin embargo, es más importante incrementar el índice de área foliar, debido a que la producción de materia seca depende de la actividad fotosintética y ésta de la radiación fotosintéticamente activa interceptada por la cubierta vegetal, la cual está en función del área foliar (Gómez, 2002).

En las variables N° de silicuas por planta, N° de granos por silicua y peso de mil granos el análisis de varianza mostró significancia para las dos primeras y la última fue no significativa. En el N° de silicuas por planta el primer grupo estuvo formado únicamente por el tratamiento 2, con un incremento del 126% sobre el testigo regional que obtuvo 314 silicuas por planta; seguido por los tra-

tamientos 8, 7, 4, 5, y 1 que mostraron ganancias entre 86 y 233 silicuas por planta sobre el testigo regional; los tratamientos con fertilizante organomineral y el testigo mostraron valores inferiores al testigo regional (Tabla 4).

Para la variable N° de granos por silicua el testigo regional se vio superado en 3% por el tratamiento 4, que presentó 33 granos por silicua; los tratamientos restantes fueron inferiores entre 1 y 6 granos por silicua con respecto al testigo regional. En el peso de mil granos, únicamente el tratamiento 10 y 4 mostraron menor peso que el testigo regional (4,1 g) y los siete tratamientos restantes fueron superiores numéricamente de 0,1 a 0,4 g (Tabla 4), estos resultados coinciden con los obtenidos por Tamago *et al.* (1999), ya que no observaron influencia de

Tabla 4. Comparación de medias para el número de silicuas por planta, número de granos por silicua y peso de mil granos para los tratamientos evaluados en canola. Nahuatzen, Mich., 2006  
Table 4. Comparison of means for the number of pods by plant, number of grains by pod and weight of thousand grains for the evaluated treatments in canola. Nahuatzen, Mich., 2006

| No. Tratamiento           | Fertilización  |                  | N° silicuas/planta | N° granos/silicua | Peso de mil granos (g) |
|---------------------------|----------------|------------------|--------------------|-------------------|------------------------|
|                           | Organo-mineral | Química          |                    |                   |                        |
| 1                         | SP             | 120-60-80        | 400 bcd            | 27 bc             | 4,2                    |
| 2                         | SP             | 90-45-60         | 711 a              | 26 c              | 4,2                    |
| 3                         | SP             |                  | 176 ef             | 26 c              | 4,5                    |
| 4                         | FS             | 120-60-80        | 493 b              | 33 a              | 3,6                    |
| 5                         | FS             | 90-45-60         | 441 bc             | 30 abc            | 4,2                    |
| 6                         | FS             |                  | 245 def            | 26 c              | 4,5                    |
| 7                         |                | 120-60-80        | 523 b              | 31 abc            | 4,2                    |
| 8                         |                | 90-45-60         | 547 ab             | 27 bc             | 4,3                    |
| <b>9</b>                  | <b>TR</b>      | <b>120-60-80</b> | <b>314 cde</b>     | <b>32 ab</b>      | <b>4,1</b>             |
| 10                        | TA             |                  | 137 f              | 26 c              | 3,8                    |
| Media general             |                |                  | 399                | 28                | 4,2                    |
| Coeficiente Variación (%) |                |                  | 18                 | 8                 | 11                     |
| Significancia             |                |                  | **                 | **                | ns                     |

SP = Silifertidol Plus, FS = Fosfosilidol, TR = Testigo regional (labranza convencional), TA = Testigo Absoluto.

distintas dosificaciones de NPK y elementos secundarios sobre el peso de 1000 granos.

Ortegón-Morales (2007) menciona que Hyolla 401 con 30 plantas  $m^{-1}$  presenta en promedio 348 silicuas por planta (Ortegón *et al.*, 2006) y un peso de 3,04 g por 1000 semillas (Berglund, 2004), estas características se modifican principalmente por la densidad de población y las condiciones climáticas (Ozer, 2003). Entre las componentes se presentan efectos compensatorios, lo que indica que a baja densidad de plantas se obtiene mayor N° de silicuas por planta, menor N° de granos por silicua y mayor peso de 1000 granos (Ali *et al.*, 1996; Momoh y Zhou, 2001; Morrison *et al.*, 1990); estos efectos compensatorios se observaron en el tratamiento 4, ya que obtuvo el cuarto lugar en la densidad de plantas (89 plantas en  $8 m^{-1}$ ) y en el N° de silicuas por planta (493 sili-

cuas), primer lugar en el N° de granos por silicua (33 granos) y el último lugar en el peso de mil granos (3,6 g).

Las componentes de rendimiento que tuvieron una influencia directa sobre la producción de grano final fueron el N° de granos por silicua y el peso de mil granos. Estos resultados, coinciden con los que obtuvo Carrillo (2005) al aplicar silicio en canola de temporal, ya que determinó que el N° de granos por silicua fue el que tuvo un efecto directo sobre el rendimiento de grano y difieren con los obtenidos por Angadi *et al.* (2003), ya que mencionan que el número de silicuas por planta es el componente de rendimiento más importante en la producción de canola.

En la Tabla 5, se muestra la comparación de medias para el rendimiento de grano y se observó que el primer grupo estuvo conformado por los tratamientos 2, 1, 4 y 7, con

Tabla 5. Comparación de medias para rendimiento de grano, de los tratamientos evaluados en canola. Nahuatzen, Mich., México, 2006  
Table 5. Comparison of means for grain yield in canola, for the treatments evaluated in canola. Nahuatzen, Mich., Mexico, 2006

| No. Tratamiento              | Fertilización           |                  | Rendimiento de grano (kg ha <sup>-1</sup> ) |
|------------------------------|-------------------------|------------------|---|
|                              | Organo-mineral          | Química          |   |
| 1                            | Silifertidol Plus       | 120-60-80        | 1986 a                                      |
| 2                            | Silifertidol Plus       | 90-45-60         | 1987 a                                      |
| 3                            | Silifertidol Plus       |                  | 796 d                                       |
| 4                            | Fosfosilidol            | 120-60-80        | 1970 a                                      |
| 5                            | Fosfosilidol            | 90-45-60         | 1889 ab                                     |
| 6                            | Fosfosilidol            |                  | 901 d                                       |
| 7                            |                         | 120-60-80        | 1925 a                                      |
| 8                            |                         | 90-45-60         | 1627 b                                      |
| <b>9</b>                     | <b>Testigo Regional</b> | <b>120-60-80</b> | <b>1285 c</b>                               |
| 10                           | Testigo Absoluto        |                  | 742 d                                       |
| Media general                |                         |                  | 1511  |
| Coeficiente de variación (%) |                         |                  | 8   |
| Significancia                |                         |                  | **  |

ganancias sobre el testigo regional de 702, 701, 685 y 640 kg ha<sup>-1</sup>, respectivamente. El mejor tratamiento fue la aplicación de Silifertidol Plus + 90-45-60, con un rendimiento de 1987 kg ha<sup>-1</sup>. Varios cultivos han mostrado incremento en rendimiento con la aplicación de silicio: arroz, en 1007 kg ha<sup>-1</sup> (Korndörfer *et al.*, 1998), caña de azúcar entre el 10 al 50% (Franco y Korndörfer, 1995), fresa en un 25%, (Miyake y Takahashil, 1986), tomate en 145%, pepino un 28% (Miyake y Takahashil, 1983) y canola un 12% (Carrillo, 2005).

El testigo absoluto, la aplicación de Fosfosilidol y Silifertidol Plus sin fertilizante químico mostraron una pérdida de 543, 489 y 384 kg ha<sup>-1</sup> respectivamente, al compararlos con el testigo regional. Estas disminuciones se presentaron debido a que la canola es un cultivo que demanda una enorme cantidad de nutrientes (Berglud *et al.*, 2007), las necesidades por cada 1000 kg de grano son

de 60 unidades de nitrógeno y 30 de fósforo (Grant y Jackson, 2000) y en los tratamientos organominerales no se aplicó nitrógeno y la cantidad de fósforo fue de 2 a 2,5 unidades; mientras que el testigo absoluto no recibió ningún nutriente.

Al realizar el análisis económico (Tabla 6), la mayor relación beneficio costo fue para el tratamiento químico 120-60-80 bajo labranza reducida, seguido del Fosfosilidol (500 kg ha<sup>-1</sup>) + 90-45-60 y el Silifertidol Plus (250 kg ha<sup>-1</sup>) + 90-45-60, con una ganancia del 63, 55 y 54% respectivamente sobre el Testigo regional.

En lo que respecta a las características químicas del suelo, en la Tabla 7 se muestra que la aplicación de 500 kg ha<sup>-1</sup> de Silifertidol Plus + 90-45-60 bajo labranza reducida incrementó la cantidad en el suelo de carbono (40%) y fósforo (24%), así mismo disminuyó la cantidad de magnesio (8%), calcio

Tabla 6. Análisis económico por cada tratamiento de fertilización evaluado en canola. Nahuatzen, Mich., 2006

Table 6. Economic analysis by each treatment of fertilization evaluated in canola. Nahuatzen, Mich., 2006

| No. Trat. | Fertilización  |                  | Rend. grano kg ha <sup>-1</sup> | Valor Produc. (\$/kg) | Ingreso Bruto (\$) | Costo Cultivo (\$/ha <sup>-1</sup> ) | Ingreso Neto (\$) | Relación B/C |
|-----------|----------------|------------------|---------------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------------------------|-------------------|--------------|
|           | Organo-mineral | Química          |                                 |                       |                    |                                      |                   |              |
| 1         | SP             | 120-60-80        | 1986                            | 3,50                  | 6951               | 5547                                 | 1404              | 1,25         |
| 2         | SP             | 90-45-60         | 1987                            | 3,50                  | 6955               | 5083                                 | 1872              | 1,37         |
| 3         | SP             |                  | 796                             | 3,50                  | 2786               | 3615                                 | - 829             | 0,77         |
| 4         | FS             | 120-60-80        | 1970                            | 3,50                  | 6895               | 5275                                 | 1620              | 1,31         |
| 5         | FS             | 90-45-60         | 1889                            | 3,50                  | 6612               | 4808                                 | 1804              | 1,38         |
| 6         | FS             |                  | 901                             | 3,50                  | 3154               | 3390                                 | - 236             | 0,93         |
| 7         |                | 120-60-80        | 1925                            | 3,50                  | 6738               | 4647                                 | 2091              | 1,45         |
| 8         |                | 90-45-60         | 1627                            | 3,50                  | 5695               | 4183                                 | 1512              | 1,36         |
| <b>9</b>  | <b>TR</b>      | <b>120-60-80</b> | <b>1285</b>                     | <b>3,50</b>           | <b>4498</b>        | <b>5047</b>                          | <b>- 549</b>      | <b>0,89</b>  |
| 10        | TA             |                  | 742                             | 3,50                  | 2597               | 2765                                 | - 168             | 0,93         |

SP = Silifertidol Plus, FS = Fosfosilidol, TR = Testigo regional (labranza convencional), TA = Testigo Absoluto.

Tabla 7. Análisis de los minerales del suelo en tres tratamientos evaluados en canola. Nahuatzen, Mich. 2006

Table 7. Analysis of the mineral soil in three treatments evaluated in canola. Nahuatzen, Mich. 2006

| Elemento | Testigo Absoluto (%) | Testigo Regional (%) | Silifertidol Plus (%) | Silifertidol Plus + 90-45-60 (%) |
|----------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------------------|
| Carbono  | 6,78                 | 6,43                 | 8,24                  | 9,48                             |
| Aluminio | 11,37                | 12,23                | 10,78                 | 10,87                            |
| Fósforo  | 0,17                 | 0,20                 | 0,22                  | 0,21                             |
| Magnesio | 0,64                 | 0,55                 | 0,71                  | 0,59                             |
| Calcio   | 1,89                 | 1,27                 | 1,67                  | 1,56                             |
| pH       | 6,07                 | 5,90                 | 6,11                  | 5,88                             |

Técnica de espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (ITSU).

(17%) y aluminio en 4%, con respecto al Testigo Absoluto bajo labranza reducida; mientras que al compararlo con el Testigo Regional (120-60-80) bajo labranza convencional el carbono, fósforo, magnesio y calcio aumentaron en 47, 24, 7 y 23% respectivamente y el aluminio se redujo en 11%, como resultado de la liberación de nutrientes durante la mineralización. Estos resultados son congruentes con los obtenidos por Clark *et al.* (1990) en sorgo, ya que con una concentración relativamente alta de silicio aplicada al suelo incrementó la materia orgánica en 7,9%, el potasio en 12% y el aluminio lo redujo en un 32%.

### Conclusiones

- La aplicación de fertilizantes organominerales en canola de secano bajo labranza reducida permiten disminuir la fertilización química (nitrógeno, fósforo y potasio) en un 25% e incrementan el índice de área foliar, número de silicuas por planta y peso de mil granos.

- La aplicación de 500 kg ha<sup>-1</sup> de Silifertidol Plus y 250 kg ha<sup>-1</sup> de Fosfosilidol más 90-45-60 de NPK bajo labranza reducida aumentaron en 55% y 53%, respectivamente el rendimiento de grano en canola con respecto al testigo regional bajo labranza convencional (120-60-80; NPK).
- El Silifertidol Plus 500 kg ha<sup>-1</sup> y Fosfosilidol 250 kg ha<sup>-1</sup> más 90-45-60 de nitrógeno fósforo y potasio mostraron un incremento del 54 y 55% respectivamente en la relación beneficio costo sobre el testigo bajo labranza convencional.
- El Silifertidol Plus bajo labranza reducida incrementó en el suelo el carbono, fósforo, magnesio y calcio; disminuyó el aluminio con respecto al testigo bajo labranza convencional.

### Bibliografía

- Angadi SV, Cutfoth HW, McConkey BG, Gan Y, 2003. Yield adjustment by canola grown at different plant populations under semiarid conditions. *Crop Sci.* 43: 1358-1366.

- Ali MH, Zaman SMH, Hossain SMA, 1996. Variation in yield, oil and protein content of rapeseed (*Brassica campestris*) in relation to levels of nitrogen, sulphur and plant density. *Indian J. Agron.* 41: 290-295.
- Anaya GM, 1989. Global assessment of soil degradation in México, GLASOD Project, Colegio de Postgraduados, Chapingo, Montecillo, México 106 p.
- Astier CM, 2007. Fortalecimiento de una metodología de evaluación de sustentabilidad a través de un estudio de caso en la Región Purhépecha, México. Proyecto de investigación. Grupo Interdisciplinario de Tecnología Rural Apropiada (GIRA A.C.) Pátzcuaro, Michoacán. <http://www.rimisp.cl/webpage.php?webid=451>.
- Berglund DR, 2002. Canola variety trials (2003). North Dakota State Univ. Ext. Serv. Bull. A-686. Fargo, ND.
- Berglund DR, 2004. Canola production (2003). North Dakota State Univ. Ext. Serv. Bull. A-1124. Fargo, ND.
- Bocco G, Velásquez A, Torres A, 2000. Ciencia, Comunidades indígenas y manejo de recursos naturales. Un caso de investigación participativa en México. *INTERCIENCIA.* 25: 64-70.
- Carrillo PL, 2005. Efecto de bioactivadores en la producción de grano y aceite en canola de temporal. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 7 de Morelia, Michoacán. 78 p.
- Clark RB, Flores CI, Gourley LM, Duncan RR, 1990. Mineral element concentration and grain field of sorghum (*Sorghum bicolor*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*) grow on acid soil. M.L. Van Beusichem (Ed.), *Plant nutrition physiology and applications*, p. 391-396. Kluwer Academic Publishers.
- DAMSA, 2006. Silicio en la Agricultura y Medio Ambiente. <http://www.dolomitagricola.com/> (13 de junio de 2006).
- Datnoff LE, Deren RN, Snyder GH, 1997. Silicon fertilization for disease management of rice in Florida. *Crop Protection.* 16: 525-531.
- Espinoza J, 2004. Fijación de fósforo en suelos derivados de cenizas volcánicas. *Informaciones Agronómicas.* No. 55: 5-8.
- Franco CJF, Kornörfer GH, 1995. Aplicação de silício (Si) em cana-de-açúcar: uma alternativa para melhorar características químicas de solos de cerrado. Annual, II Semana de Ciências Agrárias-SECA. Uberlândia.
- Gómez LBL, 2002. Simulación de granizo en trigo (*Triticum aestivum* L.). Tesis de Doctorado. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid, España. 324 p.
- Grand DJ, 2000. Effect of nitrogen and sulfur on canola yield and nutrient uptake. *Agron. J.* 92: 644-649.
- Kornörfer GH, Colombo CA, Rodríguez LL, 1998. Effect of thermo-phosphate as silicon source for sugarcane. Inter-American Sugar Cane Seminar. 9-11 Sept., Miami, FL.
- Lemus RBE, 2007. Agua y Salud: un enfoque sustentable. [www.geocities.com/congresoprograma/5-6.pdf](http://www.geocities.com/congresoprograma/5-6.pdf). (15 de marzo de 2007).
- Olarte-Ortiz O, Almaguer-Vargas G, Espinoza EJR, 2000. Efecto de la fertilización foliar en el estado nutrimental, la fotosíntesis, la concentración de carbohidratos y el rendimiento en naranjo "Valencia Late". *TERRA Latinoamericana.* 18: 339-348.
- Ortegón-Morales AS, Díaz-Franco A, González-Quintero J, 2007. Cultivares de canola y su interacción con el ambiente y método de siembra. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo.* 23: 21-28.
- Ortegón MAS, Díaz FA, Ramírez LA, 2006. Rendimiento y calidad de semilla de variedades e híbridos de canola en el norte de Tamaulipas, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 29: 181-186.
- Osuna E, 1997. Investigación de erosión y labranza de conservación en la región norte-centro de México. In: Claverán *et al.* (eds.) *Avances de Investigación en Labranza de conservación.* Libro técnico N° 1. Morelia, Mich. INIFAP. CENAPROS. pp. 199-214.
- Ozer H, 2003. The effect of plant population densities on growth, yield and yield components of two spring rapeseed cultivars. *Plant Soil Environ.* 49: 422-426.

- Marscher H, 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London. Miyake, Y. and Takahashi, E. 1983. Effect of silicon on the growth of cucumber plant in soil culture. *Soil Sci. Plant Nutr.* 29:463-471.
- Miyake Y, Takahashi E, 1983. Effect of silicon on the growth of cucumber plant in soil culture. *Soil Sci. Plant Nutr.* 29:463-471.
- Miyake Y, Takahashi E, 1986. Effect of silicon on the growth and fruit production of strawberry plants in a solution culture. *Soil Sci. Plant Nutr.* 32(2), 321-326.
- Momoh EJJ, Zhou W, 2001. Growth and yield responses to plant density and stage of transplanting in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J. Agron. Crop Sci.* 186: 253-259.
- Morrison MJ, McVetty PBE, Scarth R, 1990. Effect of altering plant density on growth characteristics of summer rape. *Can. J. Plant Sci.* 70: 139-149.
- Nielsen DC, 1996. Potential of canola as a dryland crop in Northeastern Colorado. In: J. Janick (ed). *Progress in new crops.* ASHS Press, Alexandria, VA pp: 281-287.
- Quero GE, 2006a. Silicio en la producción agrícola. Instituto Tecnológico Superior de Uruapan. 5 p. <http://loquequero.com/portal-loquequero.com> (8 de marzo de 2007).
- Quero GE, 2006b. Manejo del silicio en la producción agrícola. Instituto Tecnológico Superior de Uruapan. 4 p. <http://loquequero.com/portal-loquequero.com> (8 de marzo de 2007).
- Quero GE, 2006c. El pH y su importancia en el manejo de la producción agrícola. Instituto Tecnológico Superior de Uruapan. 4 p. <http://loquequero.com/portal-loquequero.com> (8 de marzo de 2007).
- Ramos A, 2007. Urge un programa para frenar erosión. Periódico Reforma. Noticia 54. México.
- Roberts TL, 2002. Fertilidad del suelo, altos rendimientos y rentabilidad. *Informaciones Agronómicas.* 46: 6-10.
- Steel RGD, Torrie JH, 1980. Principles and procedures of statistics a biometrical approach. 2a Edition. McGraw-Hill Kogakusha, Ltd.
- Tamagno LN, Chamorro AM, Saradón, SJ, 1999. Aplicación fraccionada de nitrógeno en colza (*Brassica napus* L. ssp *oleifera* forma *annua*). Efectos sobre el rendimiento y la calidad de la semilla. *Rev. Fac. Agron., La Plata* 104: 25-34.
- Tapia VLM, Tiscareño LM, Salinas RJ, Velásquez VM, Vega PA, Guillén AH, 2002. Respuesta de la cobertura residual del suelo a la erosión hídrica y la sostenibilidad del suelo, en laderas agrícolas. *TERRA latinoamericana* 20: 449-457.
- Tiscareño M, Gallardo M, Velásquez M, 1997. Impacto de los sistemas de labranza en las laderas. In: Claverán *et al.* (eds.) *Avances de Investigación en Labranza de conservación.* Libro técnico N° 1. Morelia, Mich. INIFAP-CENAPROS. pp. 107-122.
- Thomas P, 2003: *Canola growers manual.* Canola Council of Canada. pp 502-514.
- Turrent FA, 1986. Estimación del potencial productivo actual de maíz y frijol en la República Mexicana. Colegio de Postgraduados, Chapin-go. México.
- Velásquez M, Tiscareño M, Claverán R, Gallardo M, 1997. Erosión y productividad bajo labranza de conservación I. *Avances de investigación en suelos de ando de Michoacán.* INIFAP-CENAPROS. Folleto Técnico N° 1. 34 p.
- Zuñiga GJL, Camacho R, Uribe SG, Francisco NN, Turrent FA, 1993. Terrazas de muro vivo para sustentar la productividad en terrazas agrícolas de ladera. Folleto técnico No. 6, SARH, INIFAP. 29 p.

(Aceptado para publicación el 14 de junio de 2010)



## Composición química de la carne de conejo silvestre (*Oryctolagus cuniculus*) y viabilidad de su predicción mediante espectroscopía de infrarrojo cercano

P. González-Redondo\*, L. Velarde Gómez, L. Guerrero Herrero y V.M. Fernández-Cabanás

Departamento de Ciencias Agroforestales, Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola, Universidad de Sevilla, Ctra. de Utrera km 1, 41013 Sevilla.

\* Autor para correspondencia: Tel. 954 486 449, Fax 954 486 436, E-mail: pedro@us.es

### Resumen

En algunos países del entorno mediterráneo existe tradición de consumo de carne de conejo silvestre procedente de la caza. Sin embargo, las características de la canal y de la carne de esta especie cinegética han sido escasamente investigadas. Los objetivos de este estudio fueron analizar la composición química de la carne de conejo silvestre (*Oryctolagus cuniculus algirus*) procedente del sudoeste de la Península Ibérica y estudiar la viabilidad de la puesta a punto de una metodología rápida de análisis para su determinación mediante espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS). La carne de conejo silvestre de la subespecie *O. c. algirus* contiene un 23,7% de proteína bruta, 0,2% de grasa bruta, 74,9% de humedad y 1,2% de cenizas. Esta composición difiere de la publicada para conejos domésticos y para conejos silvestres de la subespecie *O. c. cuniculus*, siendo más magra debido a su mayor contenido de proteína y muy inferior valor de grasa. Se obtuvieron modelos basados en la espectroscopía NIR con buena capacidad de predicción para los parámetros proteína y humedad ( $r^2 = 0,70$  y ETVC = 0,39%; y  $r^2 = 0,73$  y ETVC = 0,38%; respectivamente); mientras que las calibraciones seleccionadas para grasa y cenizas no resultaron ser aceptables.

**Palabras clave:** *Oryctolagus cuniculus algirus*, conejo silvestre, carne, composición química, NIRS.

### Summary

#### Chemical composition of wild rabbit meat (*Oryctolagus cuniculus*) and viability of its prediction by near infrared spectroscopy

Wild rabbit meat is commonly consumed in many Mediterranean countries. However, the characteristics of the carcass and meat of this game species have been scarcely investigated. This study was aimed at analysing the chemical composition of hunted wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus algirus*) meat from Southern Iberian Peninsula, and studying the viability of a rapid analytical methodology for its determination by near infrared spectroscopy. Meat of the wild rabbit subspecies *O. c. algirus* has 23.7% of crude protein, 0.2% of crude fat, 74.9% of moisture and 1.2% of ash. This composition differed from the values published for domesticated rabbits and for wild rabbits of the *O. c. cuniculus* subspecies, it being leaner due to its higher protein content and its very lower fat content. NIR spectroscopy models obtained displayed a good predictive ability for the estimation of crude protein and moisture contents ( $r^2 = 0.70$  and SECV = 0.39%, and  $r^2 = 0.73$  and SECV = 0.38%, respectively), while the calibrations selected for crude fat and ash contents were not acceptable.

**Key words:** *Oryctolagus cuniculus algirus*, wild rabbit, meat, chemical composition, NIRS.

## Introducción

En algunos países del entorno mediterráneo, como España, Francia y Portugal, es tradicional el consumo de la carne de los conejos silvestres procedentes de la caza, parte de los cuales son consumidos en el entorno familiar de los cazadores (González-Redondo, 2006; González-Redondo et al., 2007b) y otra parte se comercializa en mercados de abastos (González-Redondo et al., 2007b). Sólo en España se cazan anualmente unos cuatro millones de conejos (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2008). Pese a su importancia, son pocos y fragmentarios los estudios que han caracterizado este producto cárnico (Cambero et al., 1991; Cobos et al., 1995; Slamečka et al., 1997; González-Redondo et al., 2007a; González-Redondo et al., 2008). Por el contrario, las características de la canal y de la carne del conejo doméstico son bien conocidas (revisadas, e.g., en Lebas et al., 1996; Gómez et al., 1998; Hulot y Ouha-youne, 1999; Dalle Zotte, 2000; Combes, 2004). Sin embargo, las características de ambos tipos de conejos son diferentes en lo que respecta a su genética (Branco et al., 2000), medio y modo de vida (Soriguer, 1981; Lebas et al., 1996), método para darle muerte, calidad de la carne (González-Redondo et al., 2007a) y presentación comercial, que en el conejo silvestre es eviscerado y con piel (González-Redondo et al., 2008). Por tanto los conocimientos existentes para el conejo doméstico no son extrapolables al silvestre, e incluso los consumidores los perciben como productos diferenciados (González-Redondo, 2006; González-Redondo et al., 2007b).

El control de calidad de productos animales percederos, como la carne de conejo, por métodos convencionales presenta importantes inconvenientes debido, fundamentalmente, a la destrucción de parte del producto analizado y a la reducida velocidad

de análisis. En este contexto, la tecnología NIRS o Espectroscopía en el Infrarrojo Cercano (780-2.500 nm) ha demostrado ser una valiosa herramienta en el control de calidad de productos cárnicos para una gran variedad de productos y parámetros (Monin, 1998). Los conocidos atributos de esta técnica, tales como la rapidez, bajo coste, carácter multiproducto y multiatributo, etc., unidos a su capacidad para ser situada en diferentes puntos de la cadena de producción y comercialización, sin necesidad de preparación ni destrucción de la muestra, la sitúan como una candidata idónea para la resolución de problemas ligados al control de calidad y a la autenticación de productos agroalimentarios en general y de productos de origen animal en particular (Garrido et al., 1996). La mayoría de los trabajos publicados sobre el uso de la espectroscopía NIR para la estima de constituyentes mayoritarios en carne se han realizado para porcino y vacuno (Huang et al., 2008). Sin embargo, es posible encontrar referencias bibliográficas relativas al uso de esta tecnología en carnes de otras especies animales, como avestruz (Viljoen et al., 2005), pollo (Abeni y Bergoglio, 2001), cordero (Andrés et al., 2007) y conejo doméstico (Pla et al., 2004 y 2007). A pesar del creciente número de aplicaciones desarrolladas para el análisis de productos cárnicos mediante espectroscopía NIR, no se tiene constancia de ningún trabajo relativo a la carne de conejo silvestre.

Por ello, los objetivos de este trabajo fueron analizar la composición química de la carne del conejo silvestre procedente de la caza que se comercializa en mercados de abastos, compararla con los valores publicados para la carne de conejos domésticos y estudiar la viabilidad de la puesta a punto de una metodología rápida de análisis para su determinación mediante espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS).

## Materiales y Métodos

### Material animal

Se utilizaron 53 conejos silvestres maduros (49% machos), adquiridos en forma de canal encorabrada (eviscerados y con piel) en mercados de abastos de Sevilla (España) y que procedían de cotos de caza de Andalucía en los que los conejos se cazaron durante el descaste de julio. Mediante análisis de marcadores del cromosoma X (Geraldés et al., 2006), realizados en el Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (Portugal), se determinó su pertenencia a la subespecie *O. c. algirus* típica del sudoeste de la Península Ibérica (Branco et al., 2000).

### Manipulación y toma de muestras

Los conejos se conservaron congelados (-20 °C) hasta su manipulación. Una vez descongeladas, las canales encorabradas se pesaron. Tras desollarlas, se realizó un despiece tecnológico de la canal, siguiendo la metodología propuesta por la World Rabbit Science Association (Blasco y Ouhayoun, 1996), del que se reservó para este estudio la pierna derecha de cada conejo, por ser una pieza recomendada como representativa de toda la canal en estudios de calidad de la carne en conejos (Ouhayoun y Dalle Zotte, 1996). Cada pierna se diseccionó para separar la carne del hueso. La carne incluyó la grasa intramuscular, la intermuscular y los tendones. La carne obtenida de cada muestra se homogeneizó picándola manualmente mediante un masticador (3 Claveles®) con objeto de que las submuestras usadas para la realización de los diferentes análisis fueran representativas del conjunto. Unas submuestras se utilizaron para realizar análisis de referencia del contenido de proteína, humedad, grasa y cenizas, y otra se utilizó para la recogida de espectros NIR. La submuestra usada para la recogida de los

espectros NIR se usó para obtener después otros parámetros analíticos no usados en el presente estudio.

### Análisis químicos

La composición química de la carne de la pierna se analizó siguiendo las recomendaciones de la World Rabbit Science Association (Ouhayoun y Dalle Zotte, 1996). El contenido de humedad de la carne se determinó mediante el método de secado en estufa, el de cenizas mediante incineración en horno de mufla, el de grasa bruta mediante el método Soxhlet (realizándose una hidrólisis ácida previa de la muestra con ácido clorhídrico 4N y usando éter de petróleo al 37% como disolvente) y el de proteína bruta mediante el método Kjeldahl, expresándose en todos los casos dichos contenidos como porcentaje respecto a la carne fresca (Ouhayoun y Dalle Zotte, 1996; AOAC International, 2005). Como dato de laboratorio, se asignó a cada muestra el valor medio de dos repeticiones de cada medida de proteína bruta, grasa bruta, humedad y cenizas.

### Análisis estadísticos

Utilizando el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc., 2006), se calcularon los valores medios, la desviación típica y el coeficiente de variación de los parámetros de composición química de la carne. Se calcularon correlaciones de Pearson entre el peso de las canales encorabradas y los parámetros de composición química. Para estudiar la influencia del sexo, se calcularon pruebas t para muestras independientes sobre los parámetros de composición química.

### Análisis NIR

Los espectros de reflectancia de las muestras de carne triturada fueron recogidos en

un monocromador Foss-NIRSystems 6500 SY-II (Foss NIRSystems, Silver Spring, MD), en un rango espectral comprendido entre 400 y 2.498 nm, tomando un dato de absorbancia cada 2 nm. El análisis se realizó usando un módulo de transporte. Para la recogida espectral, se utilizó una cápsula rectangular de 4,6 x 5,7 cm. Los datos de absorbancia fueron almacenados como el logaritmo de la inversa de la reflectancia ( $\log 1/R$ ), recojiéndose 1.050 datos por cada muestra. Para la obtención de cada espectro, se mediaron los espectros de dos submuestras, siendo cada subespectro el resultado de mediar 32 espectros consecutivos (16-32-16, referencia-muestra-referencia).

Todos los espectros fueron manipulados y procesados, y todas las ecuaciones de calibración fueron obtenidas usando el programa WINISI versión 1.5 (Infrasoft International, State College, PA).

Se usaron los pretratamientos espectrales Standard Normal Variate (SNV) y Detrending (DT) para corregir los fenómenos relacionados con la radiación dispersa (Barnes et al., 1989). Adicionalmente, se probaron cuatro derivadas espectroscópicas: 1,5,5,1; 2,5,5,1; 1,10,5,1 y 2,10,5,1, donde el primer dígito indica el orden de la derivada, el segundo el intervalo usado para el cálculo de la derivada, el tercero el segmento de suavizado y el cuarto el segmento usado para el segundo suavizado (Shenk et al., 1989). Todas las calibraciones se obtuvieron para los rangos espectrales NIR (1.100-2.498 nm) y visible + NIR (400-2.498 nm). Los modelos de regresión se obtuvieron usando el método de mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS). Con este método, los residuales NIR para cada longitud de onda obtenidos después del cálculo de un factor son estandarizados (dividiéndolos por las

desviaciones típicas de los residuales para una longitud de onda) antes de calcular el siguiente factor (Shenk y Westerhaus, 1995). Se obtuvieron diferentes regresiones MPLS para cada uno de los parámetros analíticos estudiados, usando para ello el algoritmo PLS1. Con objeto de determinar el número óptimo de factores en la regresión y, además, evitar el sobreajuste de los modelos, se usó el método de validación cruzada. Durante la validación cruzada, el colectivo de calibración se dividió en cuatro grupos, prediciéndose a continuación cada uno de estos grupos usando la calibración desarrollada con el resto de las muestras. Finalmente, los errores de validación se combinaron para obtener el error típico de validación cruzada (ETVC).

Se desarrollaron calibraciones permitiendo dos pases de eliminación de anómalos (T y H) como máximo antes de completar la calibración final. Los anómalos T son muestras que manifiestan diferencias significativas entre sus valores de laboratorio y los predichos, mientras que los anómalos H son definidos como muestras con espectros muy alejados ( $H > 3$ ) de la media espectral del colectivo de calibración (Shenk y Westerhaus, 1995).

La capacidad de predicción de las regresiones se evaluó examinando los valores obtenidos para los estadísticos de calibración: error típico de calibración (ETC), coeficiente de determinación de calibración ( $R^2$ ), error típico de validación cruzada (ETVC), coeficiente de determinación de validación cruzada ( $r^2$ ) y RPD o cociente entre la desviación típica de los datos de laboratorio en el colectivo de calibración y el ETVC (Williams, 2001). El criterio para la selección de las mejores calibraciones se basó en la búsqueda de los valores más altos de RPD y  $r^2$  y valores mínimos de ETVC.

## Resultados y discusión

### Composición química de la carne de conejo silvestre

Este es el primer estudio que investiga la composición química de la carne de conejo silvestre del sudoeste de la Península Ibérica en el que se conoce la subespecie a la que pertenecen los animales (*O. c. algirus*). El único trabajo previo (Cobos et al., 1995) que ha investigado la composición de la carne de conejo silvestre no especifica la subespecie, aunque probablemente se trataba de *O. c. cuniculus*.

La tabla 1 muestra la composición química de la carne de conejo silvestre obtenida en este estudio. Se encontraron diferencias respecto a los valores publicados para la composición de la pierna tanto en conejos silvestres como en razas y líneas domésticas. En nuestro estudio, se obtuvieron contenidos de humedad y de cenizas similares a los determinados por Cobos et al. (1995) en conejos silvestres españoles, probablemente obtenidos en el centro de la Península Ibérica, aunque en las muestras del presente estudio el contenido de proteína fue mayor (23,71% vs. 21,05%) y el de grasa muy inferior (0,20% vs. 2,26%).

Tabla 1. Composición química de la carne de conejo silvestre determinada mediante los análisis de referencia (n = 53)  
 Table 1. Chemical composition of wild rabbit meat determined through reference analyses (n = 53)

| Parámetro (%) | Media | DT   | Mínimo | Máximo | CV (%) |
|---------------|-------|------|--------|--------|--------|
| Proteína      | 23,71 | 0,80 | 21,92  | 25,78  | 3,37   |
| Grasa         | 0,20  | 0,13 | 0,10   | 0,60   | 65,00  |
| Humedad       | 74,86 | 0,86 | 72,21  | 76,95  | 1,15   |
| Cenizas       | 1,18  | 0,05 | 1,08   | 1,26   | 4,24   |

DT: desviación típica; CV: coeficiente de variación.

Una revisión exhaustiva de la literatura sobre la composición química de la carne de la pierna de conejos de razas y líneas domésticas de aptitud cárnica (Dalle Zotte et al., 1996; Pla et al., 1998; Szendro et al., 1998; Pla, 1999; Nizza y Moniello, 2000; Piles et al., 2000; Metzger et al., 2003; Hernández et al., 2004; Lambertini et al., 2004; Pla et al., 2004; Martínez et al., 2005; Lambertini et al., 2006; Pla et al., 2006; Marounek et al., 2007; Pascual y Pla, 2007) confirma que el contenido de humedad de la carne de los conejos silvestres de este estudio (74,86%) es similar al de los domésticos (72,2-75,1%). Lo mismo sucede con el contenido de cenizas

(1,18% silvestres vs. 1,14-1,31% domésticos, op. cit.). Sin embargo, el contenido de proteína de la carne de los conejos silvestres fue mayor que el conocido en los domésticos (23,71% silvestres vs. 19,6-22,5% domésticos, op. cit.). Además, el contenido de grasa de la carne de conejo silvestre fue acusadamente inferior al de los domésticos (0,20% silvestres vs. 0,97-5,11% domésticos, op. cit.). Por tanto, la carne de los conejos silvestres se diferencia de la de los domésticos en que es mucho más magra.

La carne de conejo silvestre analizada en esta investigación fue también más magra que la de conejos silvestres de La Mancha



(centro de la Península Ibérica) investigada por Cambero et al. (1991) usando un homogeneizado de carne de toda la canal. También fue más magra que la encontrada en el músculo *Longissimus dorsi* de conejos silvestres de Eslovaquia (Slamečka et al., 1997), que la descrita en liebre hispida (*Caprolagus hispidus*) de la India (Nath y Rao, 1983) y que la de la liebre europea (*Lepus europaeus*) del norte de la Península Ibérica (Cobos et al., 1995).

El peso de la canal encorambrada fue de  $767,8 \pm 10,9$  g (media  $\pm$  ET; CV = 10,4%). Dicho peso no se correlacionó con el contenido de proteína ( $r = 0,019$ ;  $P = 0,893$ ), grasa ( $r = -0,219$ ;  $P = 0,115$ ), humedad ( $r = -0,242$ ;  $P = 0,081$ ) ni cenizas ( $r = -0,223$ ;  $P = 0,108$ ) de la carne. Por el contrario, en conejos de aptitud cárnica se ha constatado la influencia del peso de sacrificio sobre la composición química de la carne (Szendro et al., 1998) pero su discusión respecto a la ausencia de correlación en los conejos silvestres de este estudio plantea dificultades metodológicas porque la mayoría de los estudios en conejos domésticos se realizan sacrificándolos a edades comerciales de entre nueve y 11 semanas, dependiendo de los países (Lebas et al., 1996), mientras que la edad de los conejos silvestres en el momento de cazarlos puede variar desde pocos meses hasta varios años, siendo de pesos heterogéneos al no poder controlarse qué animales que se abaten.

No se encontró influencia del sexo sobre el contenido de proteína ( $t = 0,788$ ;  $P = 0,435$ ), grasa ( $t = -0,429$ ;  $P = 0,670$ ), humedad ( $t = -1,043$ ;  $P = 0,670$ ) ni cenizas ( $t = -1,292$ ;  $P = 0,202$ ) de la carne, confirmando en el conejo silvestre la ausencia de dimorfismo sexual respecto a la composición de la carne ya conocida en razas y líneas domésticas de aptitud cárnica (Dalle Zotte et al., 1996; Szendro et al., 1998).

Las diferencias en la composición química de la carne de los conejos silvestres de este estudio respecto a la de los silvestres investigados por Cobos et al. (1995) y la de los

domésticos pudieran deberse en parte a diferencias genéticas. Los conejos silvestres de este estudio pertenecían a la subespecie *O. c. algirus*, que se distribuye por el sudoeste de la Península Ibérica, mientras que los conejos domésticos y los silvestres del resto de las localizaciones del mundo pertenecen a la subespecie *O. c. cuniculus* (Branco et al., 2000). Son también conocidas las diferencias morfológicas de los animales vivos (Soriguer, 1980) y de las canales encorambradas (González-Redondo et al., 2008), así como de algunas características de la carne, como el pH y la capacidad de retención de agua (González-Redondo et al., 2007a), entre ambas subespecies. La genética y la selección juegan un papel determinante en la composición de la carne de conejo de razas y líneas domésticas (Lukafahr et al., 1982; Pla et al., 1998; Ortiz y Rubio, 2001), por lo que la mayor distancia genética existente entre los conejos domésticos y los silvestres de este estudio explicaría en parte las diferencias encontradas en la composición de la carne.

Además de las diferencias genéticas, a la diferente composición química de la carne de conejo silvestre deben contribuir otros factores cuyo efecto es bien conocido en conejos domésticos, como la alimentación (Dalle Zotte et al., 1996; Martínez et al., 2005; Marounek et al., 2007) y otros relacionados con el alojamiento y ambiente (Pla, 1999; Metzger et al., 2003; Lambertini et al., 2006), que difieren notablemente entre los conejos silvestres y los domésticos debido a las acusadas diferencias entre el entorno de vida en libertad y el ambiente y manejo en las granjas. En particular, el conejo silvestre está expuesto en libertad a una acusada variación estacional de las reservas corporales y de la composición lipídica de la carne (Cambero et al., 1991) debida a la fluctuación de los recursos tróficos (Soriguer, 1981). De hecho, la grasa fue el parámetro que más variabilidad mostró en nuestro estudio, como también observan Cobos et al. (1995)

en conejos silvestres. El bajo contenido de grasa de la carne de los conejos silvestres de este estudio pudo haber estado propiciado entonces por un agotamiento de las reservas adiposas de los animales, causado por el descenso de la productividad de la vegetación de la que se alimentan en el entorno mediterráneo (Soriguer, 1981), típica de la época estival en que fueron cazados. También en conejos domésticos se conoce que la restricción alimenticia produce una acusada disminución del contenido de lípidos totales de los músculos, hasta el punto de que dicho contenido desciende por debajo del 1% cuando se restringen a un 70% de la ingesta normal (Gondret et al., 2000). Aun así, el contenido de lípidos totales obtenido en el presente estudio es incluso inferior, lo que sugiere el gran interés de realizar más inves-

tigaciones que confirmen la composición química de la carne de la subespecie *O. c. algirus* en condiciones diversas de procedencia geográfica de las piezas, de vegetación presente en la zona y de estación del año.

#### Características espectrales de la carne de conejo silvestre

La figura 1 muestra los espectros obtenidos a partir del colectivo de calibración de muestras de carne de conejo picada. En la región espectral correspondiente a la radiación visible, es posible observar picos de absorción característicos asociados a pigmentos musculares. En este sentido, los picos situados alrededor de 428, 548 y 576 nm se relacionan en la literatura científica con la absorción de Soret, característica de las porfirinas presen-

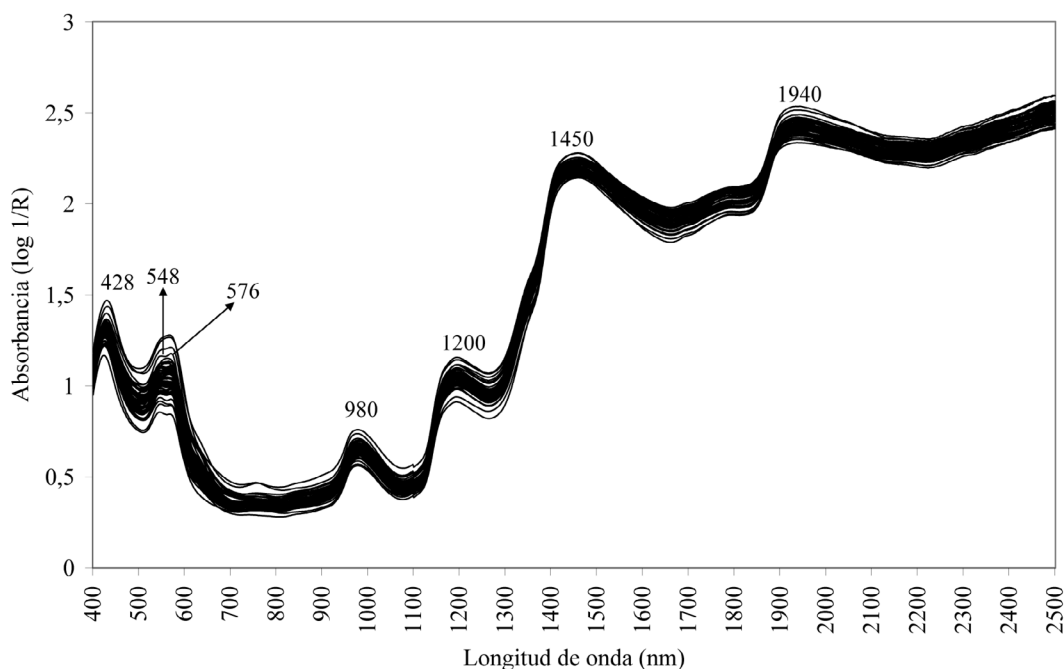


Figura 1. Espectros visible y NIR de las 53 muestras de carne de conejo silvestre utilizadas en el colectivo de calibración.

Figure 1. Visible and NIR spectra of the 53 samples of wild rabbit meat used in the calibration set.



tes en los pigmentos respiratorios; de la hemoglobina (Hb) o mioglobina (Mb) reducidas; y de la oxihemoglobina (HbO<sub>2</sub>) u oximioglobina (MbO<sub>2</sub>); respectivamente (Mitsumoto et al., 1991; Cozzolino y Murray, 2004).

Los intensos picos localizados a 980, 1.450 y 1.940 nm están relacionados con el segundo sobretono, el primer sobretono de estiramiento y el primer sobretono de flexión del enlace OH; respectivamente, asociándose con el elevado contenido de humedad de las muestras de carne fresca analizadas. Alrededor de los 1.200 nm se localiza otro pico que se podría atribuir al segundo sobretono del enlace CH que, para las muestras estudiadas, correspondería a una de las bandas de absorción de proteína. Los picos clásicos atribuidos a las bandas de absorción características de las grasas no son apreciables a 1.726, 1.760, 2.310 y 2.348 nm, debido al bajo contenido graso de este producto (Williams, 2001).

#### Ecuaciones de calibración NIRS

Los modelos de regresión desarrollados para cada parámetro analítico y pretratamientos espectrales estudiados se obtuvieron con un máximo de dos pases de eliminación de anómalos. Este límite de pases se estableció en base a la experiencia de los autores en trabajos anteriores (Fernández-Cabanás et al., 2006 y 2007), los cuales demostraron que con los dos primeros pases se podían detectar anomalías consistentes en dos productos diferentes. El número de muestras anómalas detectadas estuvo comprendido entre dos y tres (tabla 2), lo que representa entre un 3,8 y un 5,7% del colectivo inicial de calibración. Este porcentaje de anómalos detectados es similar al obtenido en los trabajos previos anteriormente citados.

Los modelos de regresión MPLS se obtuvieron usando los pretratamientos espectrales

Tabla 2. Estadísticos de calibración para las ecuaciones NIR seleccionadas para la estima de la composición química de la carne de conejo silvestre  
*Table 2. Calibration statistics for the selected equations obtained for predicting chemical components of wild rabbit meat*

| Parámetro (%) | N  | Rango espectral | Derivada    | Media | ETC  | R <sup>2</sup> | ETVC | r <sup>2</sup> | RPD  |
|---------------|----|-----------------|-------------|-------|------|----------------|------|----------------|------|
| Proteína      | 50 | Visible+NIR     | (2,10,10,1) | 23,68 | 0,24 | 0,89           | 0,39 | 0,70           | 2,05 |
| Grasa         | 50 | NIR             | (2,5,5,1)   | 0,18  | 0,08 | 0,30           | 0,09 | 0,13           | 1,44 |
| Humedad       | 50 | NIR             | (1,5,5,1)   | 74,97 | 0,23 | 0,91           | 0,38 | 0,73           | 2,26 |
| Cenizas       | 51 | Visible+NIR     | (1,5,5,1)   | 1,19  | 0,04 | 0,27           | 0,04 | 0,18           | 1,25 |

N: número de muestras usadas para el desarrollo de la calibración; ETC: error típico de calibración; R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación de calibración; ETVC: error típico de validación cruzada; r<sup>2</sup>: coeficiente de determinación de validación cruzada; RPD: cociente entre la desviación típica de los datos de laboratorio en el colectivo de calibración y el ETVC.

SNV y Detrending junto con una derivada espectroscópica. La tabla 2 muestra los valores de los estadísticos de calibración correspondientes a los mejores modelos seleccionados para la estima de cada uno de los parámetros analíticos estudiados.

La precisión de la ecuación seleccionada para la estima de proteína podría considerarse buena según los criterios de calidad propuestos por Shenk y Westerhaus (1996), presentando un valor de r<sup>2</sup> de 0,70, un ETVC de 0,39% y un RPD de 2,05. Los resultados

obtenidos por Pla *et al.* (2004) para la estima del contenido proteico de la carne de conejo doméstico fueron ligeramente mejores para el coeficiente de determinación (0,76) y de peor calidad en relación a los valores del ETVC y RPD (0,61% y 1,61; respectivamente). Estas mejoras podrían estar relacionadas con la reducción en el error del método de referencia al mediar los valores analíticos obtenidos para dos submuestras diferentes en el presente trabajo. Comparando estos resultados con los obtenidos para otras especies, encontramos de nuevo valores superiores de  $r^2$  y ETVC (0,87 y 0,64, respectivamente) para carne de avestruz (Viljoen *et al.*, 2005); pechuga de pollo (0,85 y 2,04, respectivamente) (Valdés y Summers, 1986) y carne de buey (0,87 y 18,90, respectivamente) (Prieto *et al.*, 2006). A pesar de estos buenos resultados, la aplicación en rutina de esta calibración no es recomendable, al situarse el valor del estadístico RPD por debajo de 3 (Williams, 2001).

La calibración obtenida para el primer constituyente mayoritario de la carne, la humedad, presentó unos estadísticos de calibración similares a la de proteína. Los valores de  $r^2$ , ETVC y RPD fueron 0,73, 0,38% y 2,26; respectivamente. Comparando nuevamente estos valores con los publicados para conejo doméstico, se observa que el coeficiente de determinación y el error de validación cruzada, así como el ratio RPD para este producto son superiores (0,98, 0,52% y 5,14; respectivamente). Para las otras especies anteriormente comentadas, los valores de  $r^2$  y ETVC fueron de 0,84 y 0,72; y 0,87 y 5,87; para la estima de materia seca en pechuga de pollo y carne de avestruz, respectivamente. El bajo error obtenido en la ecuación para conejo silvestre podría ser explicado nuevamente por el uso de valores medios de los datos de referencia, mientras que los valores más bajos de  $r^2$  y RPD están asociados a la baja variabilidad de este parámetro en el colectivo estudiado. El uso en rutina de

estas calibraciones podría asegurarse incorporando nuevas muestras de carne de conejos procedentes de diferentes regiones y abatidos en diferentes épocas del año, ya que estos factores podrían afectar al contenido proteico de la carne de estos animales, incrementando su variabilidad.

El modelo obtenido para la estima de grasa presentó un ETVC de 0,09%, inferior al publicado para conejo doméstico, si bien el contenido medio para éste es entre 5 y 25 veces superior al silvestre. Sin embargo, los bajos valores de  $r^2$  y RPD (0,13 y 1,44; respectivamente) desaconsejan el uso del modelo de predicción obtenido. Para las otras especies usadas en la discusión, los estadísticos  $r^2$  y ETVC fueron muy superiores: 0,99 y 0,18; 0,78 y 3,26; y 0,92 y 15,96; para carne de avestruz, pechuga de pollo y carne de buey; respectivamente. Estos resultados son consecuencia de los mayores contenidos medios y desviaciones típicas en grasa de estos productos.

La pobre capacidad de predicción obtenida para la estima del contenido en cenizas era esperable debido a que las sustancias minerales no tienen una absorción característica en la región espectral NIR y, además, a la cercanía existente entre los valores del error del método de referencia (0,04%) y la desviación típica para este parámetro en el colectivo de calibración (0,05%). No existen datos bibliográficos referentes a conejos para la discusión de estos resultados, por lo que se debe recurrir a carne de otras especies con similar composición bromatológica, como el avestruz, con valores de  $r^2$  de 0,52 (Viljoen *et al.*, 2005); así como otras carnes con composiciones más dispares, como el vacuno con  $r^2$  de 0,17 (Prieto *et al.*, 2006); o el ovino con  $r^2$  de 0,86 (Viljoen *et al.*, 2007); observándose importantes discrepancias en los estadísticos obtenidos por los diferentes autores. Las discrepancias en los estadísticos citados para la estima del contenido en cenizas de la carne

podrían estar motivadas por la existencia de correlaciones indirectas entre el contenido en minerales y otros compuestos químicos presentes en la carne con absorción significativa en la región NIR. Por ejemplo, el contenido en hierro podría ser estimado a partir del espectro de los pigmentos musculares o sanguíneos que lo contienen.

### Conclusiones

La composición química de la carne del conejo silvestre de la subespecie *O. c. algirus* difiere de la de los conejos domésticos y de los silvestres de otras localizaciones geográficas, pertenecientes ambos a la subespecie *O. c. cuniculus*, siendo más magra que la de éstos. Los modelos obtenidos para la estima del contenido en proteína y humedad en carne de conejo silvestre presentan una adecuada capacidad de predicción, aunque se recomienda ampliar los colectivos de calibración con muestras procedentes de piezas abatidas en otras zonas geográficas y épocas del año para aumentar la variabilidad en dicho colectivo. Las calibraciones obtenidas para grasa y cenizas no son aptas para el control de calidad del producto, aunque podrían ser mejoradas con las estrategias anteriormente mencionadas para el incremento de la variabilidad.

### Bibliografía

- Abeni F, Bergoglio G, 2001. Characterization of different strains of broiler chicken by carcass measurements, chemical and physical parameters and NIRS on breast muscle. *Meat Sci.* 57:133-137.
- Andrés S, Murray I., Navajas EA, Fisher AV, Lambe NR, Bünger L, 2007. Prediction of sensory characteristics of lamb meat samples by near infrared reflectance spectroscopy. *Meat Sci.* 76: 509-516.
- AOAC International, 2005. Official methods of analysis. Ed. AOAC International. Gaithersburg, EE.UU. 18ª edición.
- Barnes RJ, Dhanoa MS, Lister SJ, 1989. Standard Normal Variate transformation and De-trending of near infrared diffuse reflectance spectra. *Appl. Spectrosc.* 43: 772-777.
- Blasco A, Ouhayoun J, 1996. Harmonization of criteria and terminology in rabbit meat research. Revised proposal. *World Rabbit Sci.* 4: 93-99.
- Branco M, Ferrand N, Monnerot M, 2000. Phylogeography of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in the Iberian Peninsula inferred from RFLP analysis of the cytochrome b gene. *Heredity* 85: 307-317.
- Cambero MI, De La Hoz L, Sanz B, Ordóñez JA, 1991. Seasonal variations in lipids composition of Spanish wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) meat. *J. Sci. Food Agric.* 56: 351-362.
- Cobos A, De La Hoz L, Cambero MI, Ordóñez JA, 1995. Chemical and fatty acid composition of meat from Spanish wild rabbits and hares. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 200: 182-185.
- Combes S, 2004. Valeur nutritionnelle de la viande de lapin. *Prod. Anim.* 17: 373-383.
- Cozzolino D, Murray I, 2004. Identification of animal meat muscles by visible and near infrared reflectance spectroscopy. *LWT- Food Sci. Technol.* 37: 447-452.
- Dalle Zotte A, 2000. Main factors influencing the rabbit carcass and meat quality. 7th World rabbit Congress, Valencia, España, vol. A, pp. 507-537.
- Dalle Zotte A, Ouhayoun J, Parigi Bini R, Xiccato G, 1996. Effect of age, diet and sex on muscle energy metabolism and related physicochemical traits in the rabbit. *Meat Sci.* 43: 15-24.
- Fernández-Cabanás VM, Garrido A, García-Olmo J, De Pedro E, Dardenne P, 2007. Optimisation of the spectral pre-treatments used for Iberian pig fat NIR calibrations. *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* 87: 104-112.
- Fernández-Cabanás VM, Garrido A, Pérez-Marín D, Dardenne P, 2006. Evaluation of pretreatment strategies for near-infrared spectroscopy.

- copy calibration development of unground and ground compound feedingstuffs. *Appl. Spectrosc.* 60: 17-23.
- Garrido A, Gómez A, Guerrero JE, Fernández V, 1996. NIRS: Una tecnología de apoyo para un servicio integral en Alimentación Animal. En: *Avances en Alimentación y Nutrición Animal*. De Blas, C., Mateos, G.G. and Rebollar, P. (eds.). FEDNA. Madrid, España. pp. 275-300.
- Geraldes A, Ferrand N, Nacham MW, 2006. Contrasting patterns of introgression at X-linked loci across the hybrid zone between subspecies of the European Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Genetics* 173: 919-933.
- Gómez EA, Baselga M, Rafel O, Ramon J, 1998. Comparison of carcass characteristics in five strains of meat rabbit lines selected on different traits. *Livest. Prod. Sci.* 55: 53-64.
- Gondret F, Lebas F, Bonneau M, 2000. Restricted feed intake during fattening reduces intramuscular lipid deposition without modifying muscle fiber characteristics in rabbits. *J. Nutr.* 130: 228-233.
- González-Redondo P, 2006. Motivaciones de la ausencia de consumo de carne de conejo en una población de estudiantes universitarios. XXXI Symposium de Cunicultura, Lorca, España, pp. 157-163.
- González-Redondo P, Camacho T, Alcalde MJ, 2007a. Capacidad de retención de agua y pH de la carne de conejos de monte procedentes de la caza. II Congreso Ibérico de Cunicultura, Vila Real, Portugal, pp. 3-8.
- González-Redondo P, Payá-López R, Delgado-Núñez A, 2007b. Comparación de los hábitos de consumo de carne de conejo entre consumidores jóvenes y compradores tradicionales de Sevilla. IV Jornadas Ibéricas de Razas Autóctonas y sus Productos Tradicionales: Innovación, seguridad y cultura alimentaria, Sevilla, España, pp. 275-281.
- González-Redondo P, Ramírez-Reina MC, González-Sánchez C, 2008. Caracterización de las piezas de conejos de monte comercializadas en mercados de abastos. XXXIII Symposium de Cunicultura, Calahorra, España, pp. 32-35.
- Hernández P, Aliaga S, Pla M, 2004. The effect for growth rate and slaughter age on carcass composition and meat quality traits in rabbits. *J. Anim. Sci.* 82: 3138-3143.
- Huang H, Yu H, Xu H, Ying Y, 2008. Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. *J. Food Eng.* 87: 303-313.
- Hulot F, Ouhayoun J, 1999. Muscular pH and related traits in rabbits: a review. *World Rabbit Sci.* 7: 15-36.
- Lambertini L, Vignola G, Badiani A, Zaghini G, Formigoni A, 2006. The effect of journey time and stocking density during transport on carcass and meat quality in rabbits. *Meat Sci.* 72: 641-646.
- Lambertini L, Vignola G, Beone GM, Zaghini G, Formigoni A, 2004. Effects of chromium yeast supplementation on growth performances and meat quality in rabbits. *World Rabbit Sci.* 12: 33-47.
- Lebas F, Coudert P, De Rochambeau H, Thébault RG, 1996. *El conejo. Cría y patología*. Ed. FAO. Roma.
- Lukefahr S, Hohenboken WD, Cheeke PR, Patton NM, Kennick WH, 1982. Carcass and meat characteristics of Flemish Giant and New Zealand White purebred and terminal-cross rabbits. *J. Anim. Sci.* 54: 1169-1174.
- Marounek M, Skrivanova V, Dokoupilova A, Czauderna M, Berladyn A, 2007. Meat quality and tissue acid profiles in rabbit fed diets supplemented with conjugated linoleic acid. *Vet. Med.* 52: 552-561.
- Martínez M, Motta W, Cervera C, Pla M, 2005. Feeding mulberry leaves to fattening rabbits: effect on growth, carcass characteristics and meat quality. *Anim. Sci.* 80: 275-281.
- Metzger S, Kustos K, Szendro Z, Szabó A, Eiben C, Nagy I, 2003. The effect of housing system on carcass traits and meat quality of rabbit. *World Rabbit Sci.* 11: 1-11.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. 2008. Anuario de Estadística <http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/anuario/2008/indice.asp>

- Mitsumoto M, Maeda S, Mitsuhashi T, Ozawa S, 1991. Near infrared spectroscopy determination of physical and chemical characteristics in beef cuts. *J. Food Sci.* 56, 1493-1496.
- Monin G, 1998. Recent methods for predicting quality of whole meat. *Meat Sci.* 49 (suppl. 1): 231-243.
- Nath DR, Rao PLN, 1983. Comparative on the proximate composition of domestic and wild rabbit meat. *Cheiron-Tamil Nadu Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry* 12: 75-80.
- Nizza A, Moniello G, 2000. Meat quality and caecal content characteristics of rabbit according to dietary content and botanical origin of starch. *World Rabbit Sci.* 8: 3-9.
- Ortiz JA, Rubio MS, 2001. Effect of breed and sex on rabbit carcass yield and meat quality. *World Rabbit Sci.* 9: 51-56.
- Ouhayoun J, Dalle Zotte A, 1996. Harmonization of muscle and meat criteria in rabbit meat research. *World Rabbit Sci.* 4: 211-218.
- Pascual M, Pla A, 2007. Changes in carcass composition and meat quality when selecting rabbits for growth rate. *Meat Sci.* 77: 474-481.
- Piles M, Blasco A, Pla M, 2000. The effect of selection for growth rate on carcass composition and meat characteristics of rabbits. *Meat Sci.* 54: 345-355.
- Pla M, 1999. Carcass and meat quality of growing rabbits under high ambient temperature using high fat diets. Ed: Testik A. (ed), Baselga M. (ed.). 2nd International Conference on rabbit production in hot climates. CIHEAM-IAMZ. Adana (Turquía). *Cahiers Options Méditerranéennes* 41:93-98.
- Pla M, Guerrero L, Guardia D, Oliver MA, Blasco A, 1998. Carcass characteristics and meat quality of rabbit lines selected for different objectives: I. Between lines comparison. *Livest. Prod. Sci.* 54: 115-123.
- Pla M, Hernández P, Ariño B, Ramírez JA, Díaz I, 2007. Prediction of fatty acid content in rabbit meat and discrimination between conventional and organic production systems by NIRS methodology. *Food Chem.* 100: 165-170.
- Pla M, Martínez M, Cervera C, 2006. Growth, carcass characteristics and meat quality of rabbits given maize ears or maize plant. *Anim. Sci.* 82: 731-737.
- Pla M, Pascual M, Ariño B, 2004. Protein, fat and moisture content of retail cuts of rabbit meat evaluated with NIRS technology. *World Rabbit Sci.* 12: 149-158.
- Prieto N, Andrés S, Giráldez FJ, Mantecón AR, Lavin P, 2006. Potential use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for the estimation of chemical composition of oxen meat samples. *Meat Sci.* 74: 487-496.
- Shenk JS, Westerhaus MO, 1995. Analysis of Agriculture and Food Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. Monograph. 12101 Tech Road, Silver Spring, MD 20904, USA: NIRSystems, Inc.
- Shenk JS, Westerhaus MO, 1996. Calibration the ISI way. En: A. M. C. Davies & P. C. Williams, *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*. Chichester, UK: NIR Publications. pp. 198-202.
- Shenk JS, Westerhaus MO, Abrams SM, 1989. Protocol for NIR calibrations: Monitoring analysis results and recalibration. En: G. C. Martens, J. S. Shenk & F. E. Barton II, *Near Infrared Spectroscopy (NIRS): Analysis of Forage Quality*. USDA-ARS Agriculture Handbook, n° 643, pp. 104-110. Washington, DC: US Government Printing Office.
- Slamečka J, Mojto J, Palanská O, Hell P, 1997. Charakteristika kvality masa kralika diveho. *Folia Venatoria* 26-27: 73-77.
- Soriguer RC, 1980. El conejo, *Oryctolagus cuniculus* (L) en Andalucía Occidental: Parámetros corporales y curva de crecimiento. *Doñana, Acta Vertebrata* 7: 83-90.
- Soriguer RC, 1981. Biología y dinámica de una población de conejos (*Oryctolagus cuniculus*, L.) en Andalucía Occidental. *Doñana, Acta Vertebrata*, 8(3), 379 pp.
- SPSS Inc, 2006. Manual del Usuario de SPSS Base 15.0. SPSS Inc. Chicago, EE.UU.
- Szendro Z, Radnai I, Biró-Nemeth E, Romvári R, Milisits G, Kenessey A, 1998. The effect of live

- weight on the carcass traits and the chemical composition of meat of Pannon White rabbits between 2.2 and 3.5 kg. *World Rabbit. Sci.* 6: 243-249.
- Valdes EV, Summers JD, 1986. Determination of crude protein and fat in carcass and breast muscle samples of poultry by near infrared reflectance spectroscopy. *Poult Sci*, 65: 485-490.
- Viljoen M, Hoffman LC, Brand TS, 2005. Prediction of the chemical composition of freeze dried ostrich meat with near infrared reflectance spectroscopy. *Meat Sci.* 69: 255-261.
- Viljoen M, Hoffman LC, Brand TS, 2007. Prediction of the chemical composition of mutton with near infrared reflectance spectroscopy. *Small Rumin. Res.* 69: 1-3.
- Williams PC, 2001. Implementation of near-infrared technology. En: P.C. Williams & K.H. Norris. *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. St. Paul, Minnesota: AACC, Inc. pp. 145-171.

(Aceptado para publicación el 5 de febrero de 2010)



## Aprovechamiento del estiércol de vacuno para la biorremediación *ex situ* de suelos contaminados por diésel en México

F. Manzano-Agugliaro\*, Q.C. Hernández Escobedo\*\* y A.J. Zapata Sierra\*\*\*

\* Autor de Correspondencia. Profesor Titular de Universidad, Dpto. Ingeniería Rural, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Almería, 04120 Almería, España.  
E-mail: fmanzano@ual.es

\*\* Catedrático Universitario, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana, México. E-mail: qhernandesco@yahoo.es

\*\*\* Profesor Titular de Universidad, Dpto. Ingeniería Rural, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Almería, España. E-mail: ajzapata@ual.es

### Resumen

En el presente trabajo se analiza la experiencia del aprovechamiento del estiércol de vacuno en la descontaminación del suelo contaminado por diésel (1,4% en peso) en San Luis Potosí (México). La aplicación de una metodología sencilla y barata, permite la aplicación de la biorremediación *ex situ* de suelos contaminados con diésel. La caracterización inicial de la contaminación por hidrocarburos es muy importante, pues la concentración inicial de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) y la fracción de diésel en concreto puede determinar las dosis de estiércol y agua residual a aportar inicialmente. La técnica de excavación y colocación del suelo en biopilas dio excelentes resultados en el proceso de biorremediación, ya depositado el suelo en las biopilas se procedió a regarlo con agua no-potable. El comportamiento de la descontaminación de un suelo contaminado por diésel mediante el empleo de biopilas con adición de estiércol de vacuno puede modelizarse mediante un tipo de curva logística, y de este modo se estima que a los 183 días el 99,8% de diésel fue eliminado del suelo.

**Palabras clave:** Biorremediación, Modelización, Estiércol de Vacuno.

### Summary

#### Use of bovine manure for *ex situ* bioremediation of diesel contaminated soils in Mexico

In the present paper analyzes the experience of the use of the bovine manure at the decontamination of a contaminated soil by diesel (1,4% of the weight) in San Luis Potosí (México). The purpose of a simple methodology allows the application of *ex situ* bioremediation of soils contaminated with diesel. The initial soil characterization's of HTP (Total Petroleum hydrocarbons) and diesel concretely can determinate the initial manure and residual water to be added. The technique of excavation and soil placement biopile gave excellent results in the process of bioremediation, and deposited in the soil to biopile was watering with non-potable and bovine manure can be modelled mathematically and this estimated that we need 183 days for the 99.8% of diesel degraded soil.

**Key words:** Bioremediation, Model, Bovine Manure.

## Introducción

La contaminación por hidrocarburos derivados del petróleo genera problemas ambientales (Lin *et al.*, 2010) y en la salud humana (Labud *et al.*, 2007) al contaminar suelos y acuíferos (Hunkeler *et al.*, 2002). Esto ha llevado a desarrollar tecnologías innovadoras para la remediación de los daños causados (Whang *et al.*, 2008). Este trabajo se centra en la remediación de suelos contaminados por diésel, los cuales se producen por situaciones, como fisuras en los depósitos de almacenamiento subterráneos (Pinto *et al.*, 2007), volcaduras de camiones cisterna (Vieira *et al.*, 2006) o tuberías que transportan el hidrocarburo de un sitio a otro (Iturbe *et al.*, 2007).

Hay varias formas de transportar los hidrocarburos, entre otros, barcos, camiones cisterna, ferrocarriles y tuberías (Halmemies *et al.*, 2003). Las tuberías conectan las zonas de producción de hidrocarburos con las refinerías, las zonas de almacenamiento y las estaciones de distribución separadas por grandes distancias. México tiene una extensa red de tuberías de transporte, siendo los principales hidrocarburos transportados el petróleo crudo (oleoductos), gas (gasoductos), petroquímicos y hasta poliductos donde por la misma tubería se transporta el diésel, gasolina y gas (Iturbe *et al.*, 2007). En México existen serios problemas de contaminación por diésel, de hecho la empresa paraestatal PEMEX (Petróleos Mexicanos) reconoce la existencia de estos problemas medio ambientales en el transporte de hidrocarburos dentro del país.

Los métodos existentes para tratar estos suelos contaminados pueden ser de naturaleza física, química o biológica y tanto unos como otros pueden, aplicarse en el lugar de la contaminación (tratamiento *in situ*) o trasladarse a otro lugar para su recuperación (tratamiento *ex situ*) (Margesin y Schinner, 2001). En el método *in situ* algunas ve-

ces el material contaminado tiene que ser confinado, normalmente por aislamiento mediante grandes barreras, lo que ocasiona altos costos de mantenimiento (Gallego *et al.*, 2001). En la recuperación *ex situ* el suelo contaminado tiene riesgos en la excavación, manejo y transporte del material contaminado (Vidali, 2001).

Los métodos *ex situ* se utilizan para destruir completamente los contaminantes o transformarlos en sustancias inocuas (Rao, 1996). Estas técnicas pueden ser más rápidas, más fáciles de controlar y aplicables a un mayor conjunto de contaminantes y suelos que las técnicas *in situ* (Hanson *et al.*, 1997). Sin embargo, requieren excavación y acondicionamiento del suelo contaminado antes e incluso, a veces, después de la fase de tratamiento biológico. Incluyen tanto técnicas de tratamiento en fase sólida como en forma de lodos (Mulligan y Galvez-Cloutier, 2003).

La biorremediación es un proceso espontáneo o dirigido en el cual se utilizan procedimientos biológicos, microorganismos, para degradar o transformar los contaminantes hasta formas menos tóxicas o no tóxicas y mitigar, como consecuencia, la contaminación ambiental. En presencia de oxígeno suficiente (condiciones aerobias) y nutrientes, los microorganismos convierten, sustancias como combustibles y disolventes, en dióxido de carbono, agua y biomasa microbiana (Milton, 2007; Rahman *et al.*, 2006).

Una vez que los contaminantes son degradados, la población microbiana decrece, al consumirse lo que constituía su fuente nutritiva (Yakubu, 2007). El objetivo de las técnicas de recuperación biológica, es la creación de las condiciones ambientales óptimas para que los microorganismos se puedan desarrollar adecuadamente y provocar la máxima remediación (Korda *et al.*, 1997).

El procedimiento de biorremediación más utilizado es la bioestimulación de los microorga-

nismos ya existentes a base de adición de nutrientes, como la fuente de carbono es muy elevada (es decir, la contaminación de hidrocarburos), se tiende a un rápido agotamiento de las cantidades de nutrientes inorgánicos, tales como nitrógeno y fósforo (Alexander, 1999). Así Gallego *et al.* (2001) alcanzan el 95% de descontaminación en 45 días en ensayos de laboratorio adicionando nitrógeno y fósforo a nuestras contaminadas con diesel.

Margesin *et al.* (2007) demostraron que uno de los principales factores que afecta a la biorremediación del suelo contaminado con diesel en la concentración inicial de la contaminación, así a los 21 días un suelo sin tratamiento estaba descontaminado al 20% con una HTP (hidrocarburos totales del petróleo) de 10.000 mg/kg de suelo, al 10% para 20.000, mientras que a los 38 días lo estaba al 31,4% para 10.000 y al 10,4% para 20.000. Por otro lado si el suelo estaba fertilizado con abono inorgánico (con 9,5%  $\text{NH}_3\text{-N}$ , 5,5%  $\text{NO}_3\text{-N}$ , 6,6%  $\text{P}_2\text{O}_5\text{-P}$ , y 12,2%  $\text{K}_2\text{O-K}$ ; N/P = 2.3:1, K/P = 1,8:1; con el criterio de mantener una relación C/N de 20:1 para cada concentración de hidrocarburo), a los 38 días la descontaminación era del 53,6% para 10.000 y del 40,4% para 20.000 mg/kg de suelo.

Lin *et al.* (2010) obtienen una bioremediación natural del suelo contaminado con diesel (HTP de 1800 a 2790 mg/kg de suelo) a los 28 días del 26%, pero a los 250 días sólo llegan al 80%. Y por otro lado Serrano *et al.*, (2008) consideran que a los 100 días, un suelo contaminado por diesel (HTP 2784 mg/kg de suelo) esta remediado de forma natural al 95%, y lo esta al 99% a los 400 días.

Osman *et al.* (2009) presentan las ventajas de la utilización del estiércol de vacuno para la atenuación de la contaminación del suelo, donde para obtener una degradación del 99% se debía agregar 2,5 toneladas por hectárea. Por otro lado, Fallgren y Jin (2008) en un ensayo de laboratorio, sobre una

muestra de 120 kg de suelo contaminado de diesel obtienen una degradación en 200 días, destacando en este estudio que el estiércol de vacuno aporta, no sólo microorganismos, sino también incrementa la cantidad de nitrógeno necesaria para su multiplicación. Wellman *et al.* (2001) emplean también estiércol de vacuno para la descontaminación de un suelo contaminado con diesel (5000 mg/kg de suelo), muestran una descontaminación cercana al 80% en 41 días.

En el caso de los tratamientos en biopilas, el suelo es distribuido en montículos de hasta varios metros de altura, algunos estudios sugieren colocarlos sobre un sistema de distribución de aire que inyecte aire en cada uno de los montículos mediante una bomba de vacío. Los métodos de compostaje que se pueden aplicar, son de tres tipos: compostaje en pilas estáticas (la aireación de las pilas se hace mediante difusores o bombas de vacío), compostaje en reactores con agitación mecánica (el compostaje es mezclado y aireado en un reactor) y compostaje en grandes pilas que periódicamente se mezclan utilizando tractores o equipos similares (Bhupathiraju *et al.*, 2002).

El objetivo de este trabajo es, por un lado, analizar el proceso de recuperación *ex situ*, de un suelo contaminado por diesel mediante biorremediación con estiércol de vacuno en biopilas a gran escala y por otro modelizar el comportamiento de la degradación del diesel mediante la metodología de biorremediación empleada.

## Materiales y métodos

### Caracterización del suelo contaminado

La zona afectada se encuentra situada en San Luís Potosí, en el tramo Querétaro-San Luís Potosí en México. La contaminación se

originó por la rotura de una tubería de diesel de 81 cm de diámetro propiedad de PEMEX. En la zona afectada se observa el daño ocasionado por el derrame de combustible, al presentar una vegetación seca y con manchas del hidrocarburo. La cantidad de contaminante disminuye a medida que aumenta la distancia desde el punto de fuga, debido a la filtración en el suelo y a los trabajos de limpieza que realiza el personal de PEMEX.

Para caracterizar la superficie contaminada se tomaron muestras de suelo con una barrena manual a distintas profundidades y la planimetría de dicha muestra se determinó con GPS. Las muestras se enviaron para su caracterización al laboratorio de Aguas Residuales y Suelo de la Universidad Autónoma Metropolitana en la Ciudad de México.

Se muestrearon un total de 120 puntos, un 80% dentro del área que se consideró a

priori como contaminada y un 20% fuera de ese área. De los 96 puntos muestreados dentro del área, en 50 se muestreó hasta una profundidad de 0,2 m, en 30 puntos hasta 0,3 m, en 4 puntos hasta 1m, en 6 puntos hasta 2 m, en 3 puntos hasta 2,7m de profundidad y en 3 puntos a más de 3,5 m llegando hasta los 4,5 m de profundidad. Los 24 muestreos fuera del área se hicieron hasta 0,30 m y las muestras de suelo no presentaban humedad u olor a diésel. La caracterización final resultado de la extracción del suelo, indica que cerca del punto de fuga (P) existe mayor profundidad de suelo contaminado que en el resto de las subáreas, siendo cada vez menor cuanto más se alejan del punto de fuga, figura 1.

La tabla 1 muestra las áreas y volúmenes de suelo extraídos en cada una de las profundidades, siendo el área total contaminada de casi 4 ha.

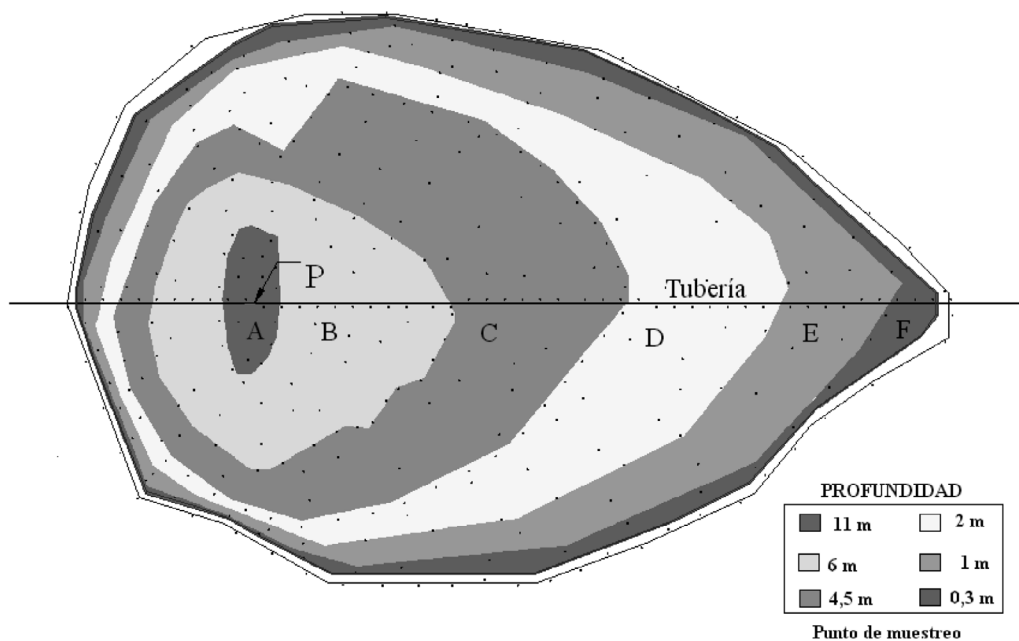


Figura 1. Puntos de muestreo y división en subáreas.  
Figure 1. Sampling points and ted sub areas characterized.

Tabla 1. Perímetro, área, profundidad y volumen de las subáreas contaminadas caracterizadas  
 Table 1. Perimeter, area, depth and volume of the sub areas characterized

| Código       | Perímetro (m)   | Área (m <sup>2</sup> ) | Volumen (m <sup>3</sup> ) | Profundidad (m) |
|--------------|-----------------|------------------------|---------------------------|-----------------|
| A            | 120,07          | 808,19                 | 8956,89                   | 11              |
| B            | 307,24          | 6.253,81               | 37212,88                  | 6               |
| C            | 500,23          | 10.781,20              | 49816,74                  | 4,5             |
| D            | 620,52          | 10.073,35              | 19730,30                  | 2               |
| E            | 713,26          | 8.160,60               | 8080,39                   | 1               |
| F            | 750,60          | 3.362,29               | 1005,77                   | 0,30            |
| <b>Total</b> | <b>3.011,92</b> | <b>39.439,51</b>       | <b>124.802,97</b>         |                 |

El suelo se caracterizó inicialmente determinando parámetros físicos y químicos, y posteriormente se analizó el contenido de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP), véase tabla 2. Las técnicas de análisis para la caracterización del suelo contaminado se hicieron de acuerdo a los métodos mostrados en la tabla 2.

#### Tratamiento de suelo contaminado

Para iniciar el tratamiento del suelo, se excavó y se confinó el suelo contaminado en un espacio destinado especialmente para ello, el traslado se realizó manualmente y con la ayuda de una retroexcavadora. La superficie del suelo se cubrió con una geo-

Tabla 2. Valores iniciales de los parámetros de suelo caracterizados al inicio del ensayo (FECHA) en las biopilas y métodos de análisis utilizados  
 Table 2. Initial values of soil parameters in the biopiles and analytical methods

| Parámetro                                | Valor                  | Norma                                      |
|--|------------------------|--|
| pH                                       | 7,1                    | AS-02 NOM-021-RECNAT-2000                  |
| Hidrocarburos totales del petróleo (HTP) | 45.000 mg/kg           | Proy-NOM-138-SEMARNAT-2003                 |
| HTP fracción diesel                      | 14.000 mg/kg           |  |
| Contenido de agua                        | 8,7%                   | AS-02 NOM-021-RECNAT-2000                  |
| Fracción de carbono orgánico             | 0,6569                 | Walkley & Black AS-07, NOM-021-RECNAT 2000 |
| Densidad real                            | 2,30 g/cm <sup>3</sup> | Picnómetro AS-04, NOM-RECNAT-2000          |
| Densidad Aparente                        | 1,10 g/cm <sup>3</sup> |  |
| Fósforo Disponible                       | 88 mg/Kg               | Bray and Kurtz (1947)                      |
| % carbono Orgánico                       | 0,6569                 |  |
| % Materia Orgánica                       | 1,13                   |  |
| Contenido de Agua                        | 8,7%                   |  |
| UFC/g                                    | 1200                   |  |

membrana, sobre ella se depositó el suelo contaminado en forma de biopila con una altura aproximada de 1,5 metros con objeto de facilitar el posterior volteo mecánico en la biopila, esta altura aproximada se ha empleado con éxito en otros trabajos donde la altura máxima de la biopilas de 1,8 a 2 m (Lin *et al.*, 2010). Dado el gran volumen de suelo a tratar, resultaría muy costoso incluir un sistema de aireación en las biopilas, por ello se sustituyó por una aireación basada en un movimiento mecánico del suelo que a su vez servía para la adición del estiércol y del agua residual, además algunos autores señalan que el laboreo del suelo facilita la evaporación del diesel en suelos contaminados (Hejazi y Husain, 2004).

Dado que el suelo es arcilloso, no se es recomendable emplear otras estrategias de descontaminación de bajo coste como la adición de fertilizantes inorgánicos, pues trabajos previos de laboratorio demuestran que estos sólo funcionan bien en suelos arenosos o limosos pero no arcillosos (Singh y Lin, 2009).

La cantidad de estiércol vacuno, que se mezcló con el suelo contaminado fue de 100 kg por cada 7000 kg de suelo contaminado, esto es aproximadamente el 1,5% en peso. Otros autores, en ensayos de laboratorio, han ensayado dosis del 5, 10, y 20% de estiércol, obteniendo los mejores resultados con la dosis más alta, con un 81% de degradación en 41 días (Wellman *et al.*, 2001), pero combinando estas dosis con sulfato amónico. Dada la magnitud del trabajo, es decir la gran cantidad de suelo a tratar no se puede emplear una dosis tan elevada. Para proporcionar los nutrientes necesarios para la actividad microbiana, se adicionó agua residual con una solución de sacarosa con una concentración de 1g/L, que aumenta la relación C/N y permite estar cerca de las necesidades microbianas (Bento *et al.*, 2005). El agua permite además incrementar el oxígeno del suelo y facilita la evaporación de algu-

nos compuestos del diesel (Hejazi y Husain, 2004), otros trabajos han demostrado (Tsai *et al.*, 2009) que la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a baja concentración mejora la eficiencia microbiana en la descontaminación por diesel.

Una semana después de completar la extracción del suelo contaminado y formar las biopilas se añadió el estiércol de vacuno en la dosis mencionada y el riego, empleando en este último 20 m<sup>3</sup> al día. El muestreo del suelo contaminado se realizó los días 0, 28, 56, 84, 112, 140, 168 y 196, siendo el resultado del HTP obtenido, el promedio a su vez de 40 muestras tomadas aleatoriamente en las biopilas.

### Análisis de datos

Para modelizar el comportamiento de la degradación del diesel se utilizó la curva logística. El modelo logístico propone que bajo ciertas circunstancias, muchas magnitudes en sistemas ecológicos y sociales evolucionan con el tiempo de acuerdo con la expresión:

$$y = \frac{k \cdot y_0 \cdot e^{i \cdot x}}{k + y_0 (e^{i \cdot x} - 1)}$$

donde  $k$  es se llama capacidad del sistema,  $i$  se llama tasa natural de incremento,  $y_0$  es el valor inicial para la curva, y  $x$  es el dato original. Una magnitud que crece de acuerdo con esa expresión se dice que presenta crecimiento logístico. Los parámetros de ajuste del modelo logístico se ajustaron por mínimos cuadrados con la herramienta solver de Excel.

### Resultados

En la figura 2 se presenta gráficamente la evolución del tanto por ciento de degradación del diésel por kilogramo de suelo a lo largo del tiempo, los puntos indican los días de muestreo.



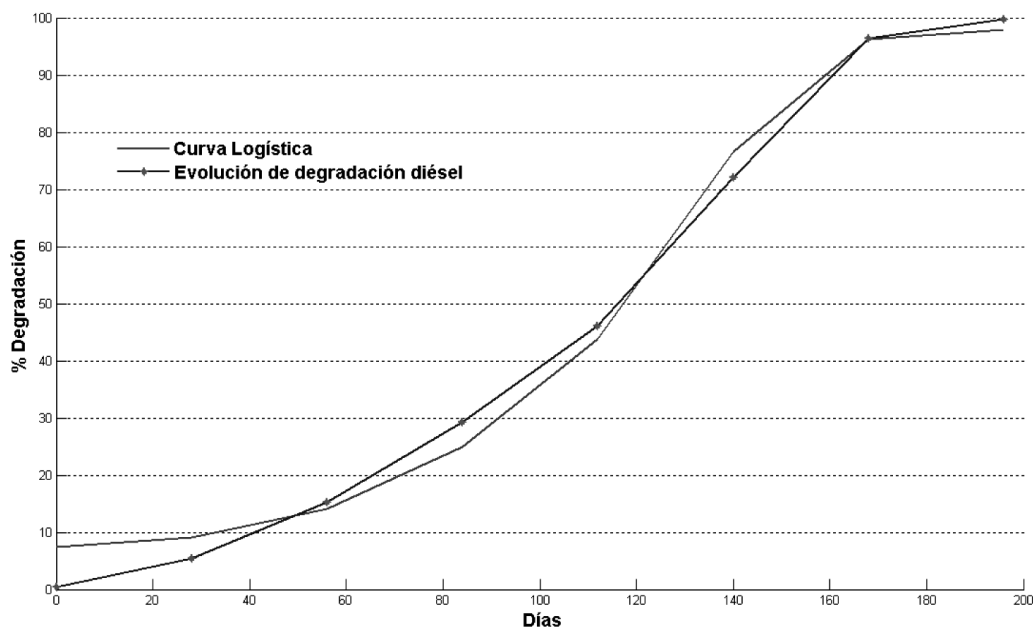


Figura 2. Evolución del porcentaje de degradación del diésel y ajuste de la curva logística.  
 Figure 2. Change with time of the degradation percentage of diesel and logistic curve adjusted.

Al final de los primeros 28 días, el nivel de degradación del diésel en el suelo se ubicaba en 5,33%. Aumentando la descontaminación del diésel al 72% tras 140 días, y al 96,4% a los 168 días.

En la figura 2 se incluye la curva logística ajustada a los datos experimentales degradación del diésel (% degradación) y en la tabla 3 se dan los valores de los parámetros de la curva ajustada.

$$y = \frac{131,2466 \cdot 2,0927 \cdot e^{0,0281 \cdot x}}{131,2466 + 2,0927 \cdot (e^{0,0281 \cdot x} - 1)}$$

Del análisis de la curva logística se deduce que, la contaminación de diésel comenzó a disminuir al tercer día cuando se empezó una reducción del 0,1% de la contaminación. La remediación total (99,8%) se estima que se alcanzó en el día 183. El muestreo a los 196 días realizado para completar otro intervalo

de muestreo de 28 días, tras el día 168 ya daba un buen nivel de descontaminación, que según se ha observado se obtuvo 13 días antes, que de haberlo sabido se podía haber dado por finalizada la remediación del suelo, con el consiguiente ahorro de coste.

Con objeto de poder comparar los resultados obtenidos con otros trabajos similares, y dado que uno de los factores más importantes en la velocidad de degradación es la concentración inicial de HTP (Margesin *et al.* 2007), se ha realizado una gráfica, figura 3, donde además se ha realizado un ajuste de los datos de dicho trabajo a los 38 días, para las series sin tratamiento del suelo y la fertilizada (NPK), para poder extrapolar hasta nuestra concentración inicial de HTP (45.000 mg/kg de suelo). Los ajustes obtenidos con factores de correlaciones superiores al 0.9686, dan un buen ajuste, para las ecuaciones que se muestran

Tabla 3. Valores estimados de los parámetros del modelo logístico

$$y = \frac{k \cdot y_0 \cdot e^{i \cdot x}}{k + y_0 (e^{i \cdot x} - 1)}$$

entre el porcentaje de degradación (y) y los días desde el inicio de la recuperación (x)

Table 3. Adjusted parameters for the logistic model,

$$y = \frac{k \cdot y_0 \cdot e^{i \cdot x}}{k + y_0 (e^{i \cdot x} - 1)}$$

where y = degradation percentage, and x = days from the beginning of the remediation process

| Parámetro        | Valor   |
|------------------|---------|
| k                | 131,25  |
| i                | 0,0281  |
| y <sub>0</sub>   | 2,0927  |
| R <sup>2</sup>   | 99,6%   |
| $\sum (x - y)^2$ | 838,714 |

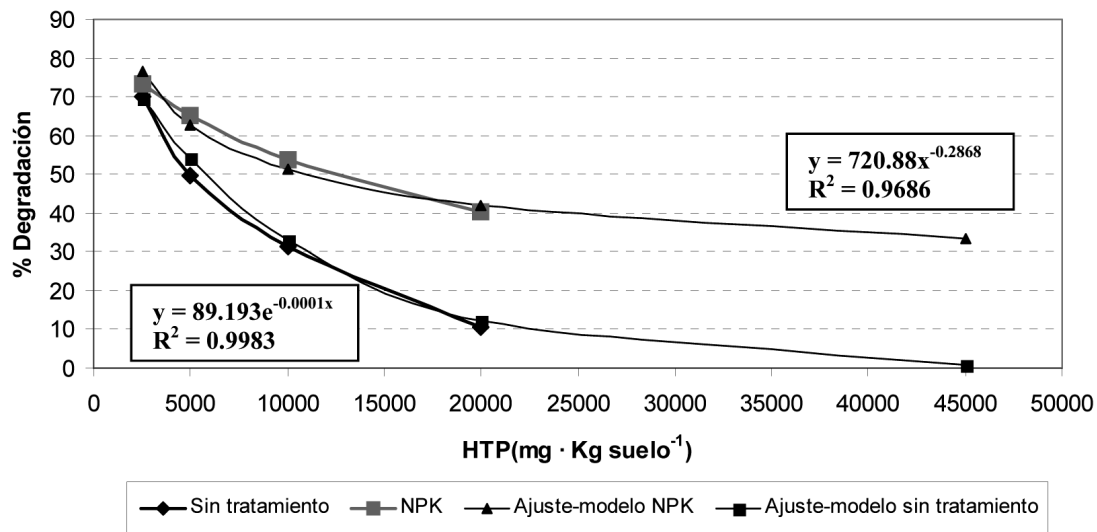


Figura 3. Modelado de degradación del HTP a los 38 días en el suelo según la concentración de HTP, para suelos sin tratamiento y con fertilizante NPK. Adaptado de Margesin et al. (2007).

Figure 3. HTP Degradation model, in the day 38, for several HTP concentration in soil with otu treatment and fertilized one (NPK). Adapted from Margesin et al. (2007).

en el gráfico. Observamos que para un suelo sin tratar la degradación es cercana al 1% y sube al 33% si el suelo está fertilizado, mientras que en nuestro caso al añadir estiércol de vacuno la degradación es del 10%.

## Discusión

En este trabajo se ha estudiado la biorremediación *ex situ* en condiciones reales de campo de alrededor de 4 ha de suelo contaminado por diesel con un volumen de cerca de 125000 m<sup>3</sup> durante 196 días. La mejor forma de medir la eficiencia del proceso de biorremediación es monitorizar el porcentaje de eliminación de hidrocarburo (HTP) del suelo (Atlas, 1992). La pérdida o degradación de HTP es la suma de dos procesos, la degradación microbiana y un proceso abiótico, formado por la evaporación, adsorción de hidrocarburos en los coloides del suelo y oxidación química entre otros procesos (Alexander, 1999). En este trabajo se han contemplado conjuntamente ambos efectos en la determinación de la curva de biorremediación porque se estimó interesante realizar el estudio en condiciones reales de campo.

Dado que la disponibilidad de nutrientes, especialmente nitrógeno y fósforo suelen ser los factores más limitantes en la efectividad de la biorremediación (Xu y Obbard 2004), se añadió estiércol de vacuno mediante mezclado mecánico y agua residual, además estos mejoran el oxígeno disponible en el suelo, que mejora a su vez la eficiencia microbiana en la descontaminación por diesel del suelo (Tsai et al., 2009).

Los resultados obtenidos en este trabajo de biorremediación campo con estiércol de vacuno son coherentes con otros trabajos de laboratorio, ya que a los 38 días se tienen unos porcentajes de degradación entre los obtenidos por Margesin et al. (2007) para suelos sin tratamiento y fertilizados con

abono inorgánico. Luego entendemos que la metodología empleada demuestra ser eficaz y además respetuosa con el medio, ya que para los volúmenes de suelo descontaminado y la alta concentración de diesel, 1,4% en peso, la cantidad necesaria de abono inorgánico sobre todo nitrógeno, sería muy elevada, para mantener la relación C/N en 20:1, teniendo en cuenta que el diesel contamina al 86% en C (Margesin et al. 2007). Además la fertilización inorgánica no funciona bien en suelos arcillosos (Singh y Lin, 2009) como es nuestro caso.

Con la curva logística deducida anteriormente para la biorremediación *ex situ*, podemos comparar nuestros resultados con otros trabajos. La descontaminación del 81% la obtendríamos en nuestro trabajo a los 150 días, muy alejado de los 41 días de Wellman et al. (2001), pero esto es lógico por dos motivos, primero que su concentración de HTP era 3 veces inferior a la nuestra, y además en ese trabajo se añadía también nitrógeno con fertilizante inorgánico, que al disminuir la relación C/N, mejoraba el crecimiento de los microorganismos, en caso contrario el N se agota rápidamente y con él, los microorganismos debido al alto contenido de carbono de los hidrocarburos como es el diesel (Molina-Barahona et al., 2004; Perfumo et al., 2006).

La descontaminación se estima completada a los 183 días con el 99,8%, este resultado es análogo a otros trabajos que obtienen 200 días en la biorremediación empleando también estiércol de vacuno (Fallgren y Jin, 2008) aunque ellos en un ensayo de laboratorio.

## Conclusión

En conclusión, la metodología empleada en este trabajo para la biorremediación *ex situ* de un suelo muy contaminado (1,4% en peso de diésel), mediante su colocación en

biopilas de 1,5 m de altura, al cual se le añadió estiércol vacuno y agua residual mediante volteo mecánico; tuvo un proceso de recuperación combinada entre factores bióticos y abióticos que se modeló matemáticamente estimando en 183 días el 99,8% de la descontaminación.

### Bibliografía

- Alexander M, 1999. Biodegradation and Bioremediation, 2nd ed. Academic Press, London.
- Atlas RM, Bartha R, 1992. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. In: Marshall, KC (Ed.) *Advances in Microbial Ecology*, Vol. 12. Plenum Press, New York, pp 287-338.
- Bento FM, Camargo FAO, Okeke BC, Frankenberger WT, 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*. 96. pp. 1049-1055.
- Bhupathiraju VK, Krauter P, Holman HN, Conrad ME, Daley PF, Templeton AS, Hunt JR, Hernandez M, Álvarez L, 2002. Assessment of in-situ bioremediation at a refinery waste-contaminated site and an aviation gasoline contaminated site. *Biodegradation*. 13. pp. 79-90.
- Bray RH, Kurtz LT, 1947. Determination of total organic and available forms of phosphorus in soils, *Soil Sci*. 59, pp. 39-45.
- Fallgren PH, Jin S, 2008. Biodegradation of petroleum compounds in soil by a solid-phase circulating bioreactor with poultry manure amendments. *Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*. 43, pp. 125-131.
- Gallego JLR, Loredó J, Llamas JF, Vazquez F, Sanchez J, 2001. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation* 12 (5) pp. 325-335.
- Halmemies S, Gröndahl S, Asffman M, Neninen K, 2003. Vacuum extraction based response equipment for recovery of fresh fuel spills from soil. *Journal of Hazardous Materials*. 97. pp. 127-143.
- Hanson KG, Anuranjini J, Madhavi K, Anjana J, 1997. Bioremediation of Crude Oil Contamination with *Acinetobacter* sp. A3. *Current Microbiology*. 35. pp. 191-193.
- Hejazi RF, Husain T, 2004. Landfarm performance under arid conditions. 2. Evaluation of parameters. *Environ. Sci. Technol*. 38, pp. 2457-2469.
- Hunkeler D, Hohener P, Zeyer J, 2002. Engineered and subsequent intrinsic in situ bioremediation of a diesel fuel contaminated aquifer. *Journal of Contaminant Hydrology* : 59 (3-4) pp. 231-245.
- Iturbe R, Flores C, Castro A, Torres L, 2007. Subsoil contamination due to oil spills in zones surrounding oil pipeline-pump stations and oil pipeline right-of-ways in Southwest-Mexico. *Chemosphere*. 68. pp. 893-906
- Korda A, Santas P, Tenente A, Santas R, 1997. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. *Applied Microbial Biotechnology*., 48. pp. 677-686.
- Labud V, Garcia C, Hernandez T, 2007. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere*. 66. pp. 1863-1871.
- Lin TC, Pan PT, Cheng SS, 2010. Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 176 (1-3), pp. 27-34.
- Margesin R, Schinner F, 2001. Biodegradation and bioremediation in extreme environments. *Applied Microbial Biotechnology*. 56. 650-663.
- Margesin R, Hammerle M, Tscherko D, 2007. Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: Effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. *Microbial Ecology* 53 (2) pp. 259-269.
- Molina-Barahona L, Rodríguez-Vázquez R, Hernández-Velasco M, Vega-Jarquín C, Zapata-Pérez O, Mendoza-Cantu A, Albores A, 2004. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. *Appl. Soil Ecol*. 27, pp. 165-175.

- Milton HS, Jr, 2007. Beneficial bacteria and bioremediation. *Water Air Soil Pollut.* 187. pp.1-3.
- Mulligan C, Galvez-Cloutier R, 2003. Bioremediation of Metal Contamination. *Environmental Monitoring and Assessment*, 84, pp. 45-60.
- Norma Mexicana AS-02, NOM-021-RECNAT-2000.
- Norma Mexicana AS-04, NOM-021-RECNAT-2000.
- Norma Mexicana AS-07, NOM-021-RECNAT 2000.
- Norma Mexicana Proy-NOM-138-SEMARNAT-2003.
- Osman K, Al-Rehiyani S, Al-Deghairi M, Salama A, 2009. Bioremediation of oxamyl in sandy soil using animal manures. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 63. pp. 341-346.
- Perfumo A, Banat IM, Marchant R, Vezzulli L, 2006. Thermally enhanced approaches for bioremediation of hydrocarbon contaminated soils. *Chemosphere*, 66(1). pp. 1-6.
- Pinto MA, de Arruda AP, Kataoka G, de Franceschi G, Bonotto DM, 2006. Laboratory study on the Bioremediation of diésel oil contaminated soil from a petrol station. *Brazilian Journal of Microbiology.* 38. pp. 346-353.
- Rao PS, Davis GB, Johnston CD, 1996. Technologies for enhanced remediation of contaminated soils and aquifers: an overview, analysis and case studies. In: *Contaminants and the Soil Environment in the Australia Pacific Region, Kluwer Academic Publishers.* 6. pp. 361-410.
- Serrano A, Gallego M, Gonzalez JL, Tejada M, 2008. Natural attenuation of diésel aliphatic hydrocarbons in contaminated agricultural soil. *Environmental Pollution.* 151. pp. 494-502.
- Singh C, Lin J, 2009. Evaluation of nutrient addition to diesel biodegradation in contaminated soils. *African Journal Of Biotechnology* 8 (14) pp. 3286-3293.
- Tsai TT, Kao CM, Surampalli RY, Chien HY, 2009. Enhanced Bioremediation of Fuel-Oil Contaminated Soils: Laboratory Feasibility Study. *Journal Of Environmental Engineering-Asce.* 135. pp. 845-853.
- Vidali M, 2001. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry.* 73. pp. 1163-1172.
- Vieira PA, Viera RB, Franca de FP, Cardoso VL, 2006. Biodegradation of effluent contaminated with diésel fuel and gasoline. *Journal of Hazardous Materials.* 140. pp. 52-59.
- Whang LM, Liu PWG, Ma CC, Cheng SS, 2008. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *J. Hazard. Mater.* 151 pp. 155-163.
- Wellman DE, Ulery AL, Barcellona MP, Duerr-Auster S, 2001. Animal waste-enhanced degradation of hydrocarbon-contaminated soil. *Soil & Sediment Contamination.* 10. pp. 511-523.
- Xu R, Obbard JP, 2004. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in oil-contaminated beach sediments treated with nutrient amendments. *J Environ Qual* 33. pp. 861-867.
- Yakubu, MB, 2007. Biological approach to oil spills remediation in the soil. *African Journal Of Biotechnology* 6 (24) pp. 2735-2739.

(Aceptado para publicación el 22 de febrero de 2010)

## Efecto del contenido en nitrógeno del medio de incubación sobre la producción de gas y la predicción de la digestibilidad aparente de la materia orgánica de ensilados de hierba

A. García-Rodríguez\*, I. Goiri\*, G. Flores\*\*, L.M. Oregui\*

\* Autor para la correspondencia, Teléfono: 902540546. E-mail: aserg@neiker.net  
Neiker-Tecnalia, Granja Modelo de Arkaute, Apdo. 46, 01080 Vitoria-Gasteiz

\*\* Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM), Apdo. 10, 15080 A Coruña

### Resumen

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del contenido en nitrógeno del medio de cultivo sobre la cinética de producción de gas y sobre la estima de la digestibilidad aparente de la materia orgánica de ensilados de hierba. Para ello, se evaluaron mediante la técnica de producción de gas 24 muestras de ensilados de hierba de digestibilidad aparente de la materia orgánica conocida de una colección de muestras del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo. Los ensilados de hierba se incubaron con líquido ruminal tamponado con medio de cultivo suplementado o no con nitrógeno, y la producción de gas obtenida se ajustó a un modelo basado en la generalización de Michaelis-Menten. De los resultados obtenidos se deduce que la cantidad de nitrógeno aportado por el inoculo bacteriano y el ensilado de hierba no fue suficiente para mantener un óptimo crecimiento microbiano (16,7 vs. 23,1 h necesarias para alcanzar la mitad de la producción potencial de gas en un medio con y sin suplementación de nitrógeno respectivamente;  $P < 0,001$ ). En consecuencia, tanto las correlaciones encontradas entre los parámetros obtenidos del ajuste con un medio no suplementado con nitrógeno con la composición química, o con la digestibilidad aparente fueron peores que los obtenidos con medio suplementado. Todo ello condujo a unas peores ecuaciones de predicción de la digestibilidad aparente al utilizar el medio de cultivo no suplementado en nitrógeno ( $r^2 = 0,519$ ) frente a otro suplementado ( $r^2 = 0,758$ ).

**Palabras clave:** *in vitro*, rumen, valoración alimentos.

### Summary

#### Effect of incubation medium nitrogen content on gas production and prediction of apparent organic matter digestibility of grass silage

This assay was carried out in order to evaluate the effect of the culture medium N content on gas production and on apparent organic matter digestibility prediction of grass silage. To carry out this experiment, 24 grass silage samples of known apparent organic matter digestibility were selected from the collection belonging to the Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo. Samples were incubated in buffered rumen fluid supplemented and non supplemented with nitrogen and the obtained cumulative gas production was adjusted to a generalized Michaelis-Menten model. Culture medium and sample nitrogen content were not high enough to allow an optimal microbial growth and activity (16.7 vs. 23.1 h to obtain the half of potential gas production with and without nitrogen supplementation;  $P < 0.001$ ). As a consequence, the correlations between the gas production parameters obtained with a non supplemented medium and the chemical constituents or the apparent organic matter digestibility were worse than those obtained with a supplemented culture medium. All these results led to a worse apparent organic matter digestibility predictive equation when a non supplemented nitrogen culture medium was used ( $r^2 = 0.519$ ) compared with those obtained with supplemented medium ( $r^2 = 0.758$ ).

**Key words:** *in vitro*, rumen, feedstuff evaluation.



## Introducción

La técnica de producción de gas es una metodología *in vitro* barata y sencilla que se ha venido utilizado en la valoración de los alimentos (Menke et al., 1979; Khazaal et al., 1993). No obstante, la relación entre los parámetros de producción de gas y las características de los alimentos, en especial con la digestibilidad, puede verse afectada por diversos factores. Entre ellos cabría destacar la influencia de la composición del medio de cultivo, y en particular, su contenido en nitrógeno (Rymer et al., 1999).

Es preciso tener en cuenta que en muchos ensayos *in vivo* los alimentos se aportan sin ningún aporte adicional de nitrógeno. Por lo tanto, se podría pensar que empleando un medio no suplementado en nitrógeno, la técnica de producción de gas podría estar simulando mejor las condiciones del ensayo *in vivo*, lo que permitiría mejores estimas de la digestibilidad aparente de la materia orgánica (DMO). De hecho, en los primeros estudios dirigidos a obtener estimas de la DMO utilizando esta técnica, se empleó un medio de cultivo no suplementado en nitrógeno (Menke et al., 1979).

La disponibilidad de nitrógeno afecta principalmente a la cinética de producción de gas (Dryhurst y Wood, 1998). Al ser esta la característica con una mayor relación con la DMO (Khazaal et al., 1993), el aporte o no de nitrógeno al medio de cultivo podría afectar a la estima de la DMO obtenida mediante la técnica de producción de gas.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto del contenido en nitrógeno del medio sobre la cinética de producción de gas, sobre la correlación entre los parámetros de producción de gas y la composición química o la DMO, y sobre la estima de la DMO de ensilados de hierba.

## Materiales y Métodos

### Ensilados de hierba

Se seleccionaron 24 muestras de ensilado de hierba (tabla 1) pertenecientes a una colección de 197 muestras, de digestibilidad aparente conocida, evaluadas desde 1984 en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM). Esta colección incluye ensilados de características diferentes, tanto en lo que se refiere a las características de la pradera (localización geográfica, composición botánica, precocidad del corte o número del ciclo de aprovechamiento), como en lo referente a la tecnología utilizada para realizar el ensilado (tipo de silo, realización de prehenificado o tipo de cosechadora).

### Análisis químico

De forma paralela a la evaluación de la digestibilidad, de cada alimento se tomaron dos submuestras. Una de ellas fue secada en estufa de aire forzado Unitherm, a 80 °C, durante 16 horas, para la determinación por gravimetría del contenido en materia seca (MS), mientras que la otra se conservó sin desecar. El contenido en MS se corrigió por las pérdidas de volátiles durante el secado en estufa siguiendo la metodología propuesta por Dulphy y Demarquilly (1981), aplicando una corrección de 10,3 g kg<sup>-1</sup> al valor obtenido tras el análisis gravimétrico.

La submuestra no desecada se empleó para la determinación de pH, N-total y N-amoniaco. Para ello, de acuerdo a la metodología desarrollada por Laboratorio Agrario e Fitopatológico de Mabegondo, se realizaron tres fracciones. Con la primera fracción se realizó un macerado, para lo que se mezclaron 50 g de muestra y 150 ml de agua destilada a temperatura ambiente durante 2 horas. El sobrenadante resultante se empleó para la determinación del pH, median-

Tabla 1. Medias, error estándar (s.e.) y rango obtenidos para la composición química, indicadores de la fermentación del ensilado y digestibilidad aparente  
 Table 1. Means, standard error (s.e.) and range obtained for the chemical composition, silage fermentative indicators and apparent digestibility

|   | Ensilado de hierba (n=24) |       |             |
|---|---------------------------|-------|-------------|
|   | Media                     | s.e.  | Rango       |
| <i>Composición química (g kg<sup>-1</sup> MS<sub>c</sub>)</i> |                           |       |             |
| Materia Seca (MS <sub>c</sub> )                               | 234,3                     | 83,7  | 143,0-528,0 |
| Proteína Bruta (PB)   | 142,2                     | 39,0  | 60,5-242,3  |
| Nitrógeno soluble (% N total)                                 | 49,28                     | 12,26 | 27,59-71,43 |
| NH <sub>3</sub> (% N total)                                   | 9,09                      | 4,66  | 2,92-16,58  |
| Fibra Neutro Detergente (FND)                                 | 518,7                     | 77,6  | 341,2-637,3 |
| Fibra Acido Detergente (FAD)                                  | 357,0                     | 49,8  | 251,6-458,1 |
| Lignina Acido Detergente (LAD)                                | 65,3                      | 22,3  | 34,6-122,0  |
| Celulosa (CEL)  | 26,3                      | 4,2   | 14,9-34,4   |
| <i>Indicadores de la fermentación del ensilado</i>            |                           |       |             |
| pH  | 4,27                      | 0,30  | 3,60-4,90   |
| NH <sub>3</sub> (% MS <sub>c</sub> )                          | 0,23                      | 0,10  | 0,04-0,63   |
| <i>Determinaciones in vivo (g kg<sup>-1</sup>)</i>            |                           |       |             |
| Digestibilidad aparente de la materia orgánica                | 664,3                     | 80,2  | 508,6-804,8 |

s.e.: error estándar.

MS<sub>c</sub>: Materia seca corregida por pérdida de volátiles según Dulphy y Demarquilly (1981).

te pHmetro provisto de electrodo combinado, y del N-amoniaco, usando un electrodo selectivo (Orion). La segunda fracción se empleó para la realización de un segundo macedado, con agua destilada a 80 °C determinándose el N-soluble mediante digestión macro Kjeldahl, según el método oficial n° 3 del (Mapa, 1995), seguido por destilación y determinación volumétrica del ión amonio. El contenido en nitrógeno-total (Nt) se realizó sobre la tercera fracción, mediante la digestión macro Kjeldahl descrita anteriormente.

La submuestra desecada se utilizó para la evaluación del contenido en humedad residual, cenizas (CZ), proteína bruta (PB), fibra neutro detergente (FND), fibra ácido deter-

gente (FAD), celulosa (CEL) y lignina ácido detergente (LAD).

El contenido en humedad residual y CZ se determinó mediante desecación a 102 °C y posterior calcinación secuencial a 460 °C en un analizador termogravimétrico MAC500 (LECO Corporation, St Joseph, MI, EEUU), siendo expresado el valor de materia orgánica (MO) como 1000-CZ. La proteína bruta resultó de multiplicar por 6,25 el contenido de N total obtenido del análisis de la muestra mediante digestión micro Kjeldahl. La determinación de FND se efectuó siguiendo el procedimiento propuesto por Van Soest *et al.* (1991), y la de FAD y CEL según Goering y Van Soest (1970). La determinación del contenido

en LAD se realizó a partir del residuo insoluble en detergente, mediante el método lignina-sulfúrico de Goering y Van Soest (1970). Los contenidos de FND y FAD se expresaron libre y con cenizas, respectivamente.

#### Determinación de la digestibilidad aparente

Para la evaluación de la DMO, realizada en el CIAM, se utilizaron un mínimo de cinco carneros castrados de raza gallega de más de dos años de edad, alojados en jaulas metabólicas dotadas de separadores de heces y orina. Los animales, que disponían de bloques de corrector vitamínico-mineral a libre disposición, recibieron ensilado como único alimento. El nivel de alimentación fue *ad libitum*, ajustándose la oferta para permitir un 10% de rechazo. El alimento fue ofrecido diariamente en una única comida, a primera hora de la mañana, sin ningún tipo de suplementación externa de nitrógeno.

Los carneros dispusieron de un periodo de aclimatación a cada ensilado y a las jaulas metabólicas de 10 días. El ensayo de digestibilidad se prolongó 11 días más, en los que se cuantificó diariamente el alimento ofrecido y rechazado. Se tomaron alícuotas equivalentes al 10% del alimento ofrecido y rechazado diariamente. Igualmente, se determinó la producción de heces, tomándose una muestra equivalente al 20% de la cantidad total producida por cada animal. Las muestras tomadas diariamente se acumularon y se congelaron a  $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el final del ensayo para su posterior análisis físico-químico. Finalmente, la DMO se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$DMO(\text{gkg}^{-1}) = 1000 \times \frac{(MO_i - MO_e)}{MO_i}$$

donde  $MO_i$  y  $MO_e$  son la cantidad de MO ingerida y excretada, respectivamente.

#### Ensayos de producción de gas

Cada muestra se incubó por triplicado en dos series independientes realizadas en semanas diferentes. En cada serie se incubaron las mismas muestras de forma paralela en medio suplementado (McDougall, 1948) o no suplementado (Menke *et al.*, 1979) con nitrógeno. La composición de ambos medios de incubación se indica en la tabla 2. El aporte de nitrógeno del medio de cultivo suplementado con N ( $\text{N}^+$ ) se calculó como la suma de la cantidad aportada por la solución tampón y la solución reductora. Ambas contribuyeron al medio de cultivo final en un 21% y 6% (v/v), respectivamente.

Una descripción detallada del procedimiento llevado a cabo para la determinación de la producción de gas se puede encontrar en García-Rodríguez *et al.* (2005). Señalar que al comienzo de cada serie se determinó el contenido en  $\text{NH}_3$  del líquido ruminal utilizado como inóculo siguiendo el procedimiento descrito por Weatherburn (1967).

#### Ajuste de la producción de gas

La curva de producción acumulada de gas del ensilado de hierba se ajustó mediante el modelo propuesto por Groot *et al.* (1996). Este modelo toma la forma:

$$G = \frac{A}{(1 + B^c/t^c)}$$

Donde G ( $\text{ml g}^{-1} \text{MO}$ ) es la producción de gas a tiempo "t", y "A", "B" y "c" son constantes. Así, "A" ( $\text{ml g}^{-1} \text{MO}$ ) representa la producción potencial de gas, "B" (h) es el tiempo de incubación para el que se alcanza la mitad de la producción potencial de gas, y "c" es una constante adimensional que determina la forma de la curva.

A partir de los parámetros "B" y "c" se puede calcular la tasa de producción de gas (R,

Tabla 2. Composición y cantidades aportadas del medio suplementado en N (N<sup>+</sup>) o no (N<sup>-</sup>)  
 Table 2. Composition and quantity added of medium supplemented (N<sup>+</sup>) or not (N<sup>-</sup>)

|  | N+                           | N-                            |
|--|------------------------------|-------------------------------|
| <b>Solución de macrominerales</b>                    | <b>208 ml l<sup>-1</sup></b> | <b>237 ml l<sup>-1</sup></b>  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O | 9,45 g l <sup>-1</sup>       | 5,70 g l <sup>-1</sup>        |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 6,20 g l <sup>-1</sup>       | 6,20 g l <sup>-1</sup>        |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                 | 0,60 g l <sup>-1</sup>       | 0,60 g l <sup>-1</sup>        |
| <b>Solución tampón</b>                               | <b>208 ml l<sup>-1</sup></b> | <b>237 ml l<sup>-1</sup></b>  |
| NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>                     | 4,00 g l <sup>-1</sup>       |                               |
| NaHCO <sub>3</sub>                                   | 35,00 g l <sup>-1</sup>      | 38,28 g l <sup>-1</sup>       |
| <b>Solución reductora</b>                            | <b>62 ml l<sup>-1</sup></b>  | <b>71,3 ml l<sup>-1</sup></b> |
| Cisteína-HCl   | 6,25 g l <sup>-1</sup>       |                               |
| 1M NaOH  | 40 ml l <sup>-1</sup>        | 3,74 ml l <sup>-1</sup>       |
| Na <sub>2</sub> S·10H <sub>2</sub> O                 | 6,67 g l <sup>-1</sup>       | 0,70 g l <sup>-1</sup>        |
| <b>Solución de microminerales</b>                    | <b>0,1 ml l<sup>-1</sup></b> | <b>0,1 ml l<sup>-1</sup></b>  |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                 | 13,2 mg ml <sup>-1</sup>     | 13,2 mg ml <sup>-1</sup>      |
| MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O                 | 10,0 mg ml <sup>-1</sup>     | 10,0 mg ml <sup>-1</sup>      |
| CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                 | 1,0 mg ml <sup>-1</sup>      | 1,0 mg ml <sup>-1</sup>       |
| FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O                 | 8,0 mg ml <sup>-1</sup>      | 8,0 mg ml <sup>-1</sup>       |
| <b>Solución de resazurin</b>                         | <b>1 ml l<sup>-1</sup></b>   | <b>1,2 ml l<sup>-1</sup></b>  |
| Resazurin  | 0,01 g l <sup>-1</sup>       | 0,01 g l <sup>-1</sup>        |

h<sup>-1</sup>), a tiempo "t", a partir de la siguiente ecuación (Groot et al., 1996):

$$R = \frac{c \times t^{c-1}}{B^c + t^c}$$

Para "c" > 1 la tasa de producción de gas aumenta hasta llegar a un máximo (RM). El tiempo de incubación al que sucede RM (t<sub>RM</sub>) se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$t_{RM} = B \times (c - 1)^{1/c}$$

Los parámetros de esta ecuación se calcularon utilizando un procedimiento de regresión no lineal que minimiza, mediante el algoritmo de Marquardt, las distancias de los puntos a la curva resultante del ajuste (SAS, 2002).

#### Cálculos y análisis estadísticos

En este ensayo se ha considerado que la cantidad de nitrógeno total aportado por el alimento al medio de incubación fue la suma del nitrógeno amoniacal y del soluble del ensilado.

El efecto del aporte de N del medio sobre la producción acumulada de gas en los distintos momentos de incubación, así como sobre los parámetros y los valores medios de la tasa de producción de gas, se realizó mediante análisis de varianza (GLM) utilizando el paquete estadístico SAS (SAS, 2002). En este análisis se tomó el medio de cultivo utilizado (N<sup>+</sup> y N<sup>-</sup>) como único tratamiento, y a la muestra como repetición.

De forma paralela, se realizó un análisis de correlación de Pearson entre los parámetros del ajuste de la curva de producción de gas, obtenidos con ambos medios ( $N^+$  y  $N^-$ ), y la composición química del ensilado (FND, FAD, CEL, LAD y PB) y la DMO, y entre la tasa de producción de gas (R) a lo largo del tiempo de incubación, con la DMO.

Para cada uno de medios de incubación ( $N^+$  y  $N^-$ ), se realizó un estudio de regresión múltiple entre la DMO del ensilado de hierba y los parámetros resultantes del ajuste de la curva de producción de gas (A, B, c), utilizando un procedimiento de selección por tramos hacia delante. La estimación de la bondad del ajuste y el error de predicción de las regresiones obtenidas se evaluaron mediante el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y la desviación estándar de los residuos (d.e.r.), respectivamente.

## Resultados

### Producción de gas

La producción acumulada de gas obtenida utilizando los medios de cultivo  $N^+$  y  $N^-$ , a lo largo de las 96 h de incubación, se representa en la figura 1. Tal como se puede apreciar, la producción total de gas obtenida de la incubación de las muestras con el medio de cultivo  $N^+$  fue superior a la obtenida utilizando el medio  $N^-$ , siendo estas diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) para la totalidad de tiempos de determinación de gas. Además, se puede observar que estas diferencias fueron mayores a tiempos cortos (a excepción de la medida realizada a las 2 horas) y medios del periodo de incubación.

Los valores medios de los parámetros obtenidos del ajuste de la curva de producción de

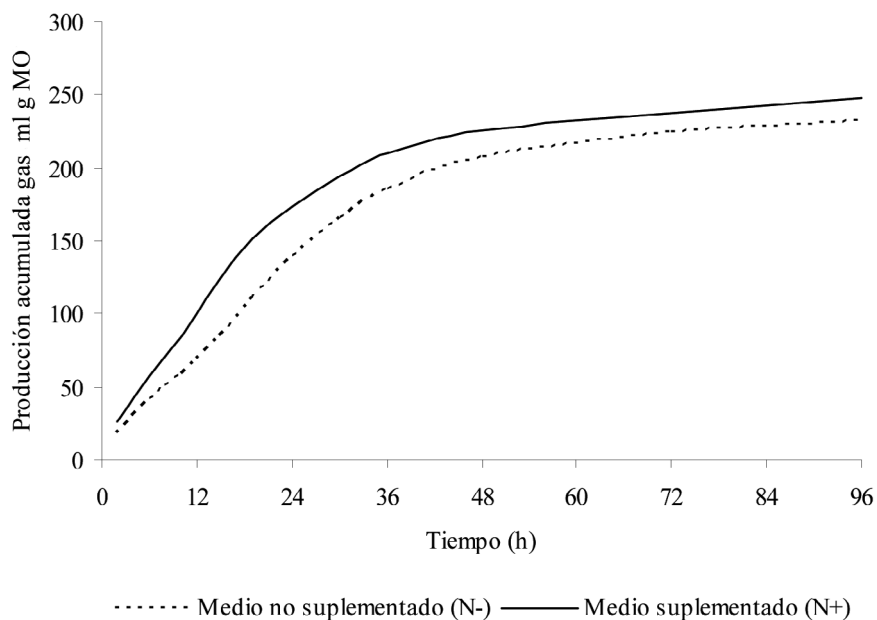


Figura 1. Evolución de la producción acumulada de gas a lo largo del tiempo de incubación utilizando un medio suplementado en N ( $N^+$ ) o no ( $N^-$ ).

Figure 1. Cumulative gas production evolution with incubation time using a supplemented ( $N^+$ ) or non supplemented ( $N^-$ ) with nitrogen culture medium.

gas con ambos medios de cultivo se indican en la tabla 3. En la misma puede observarse que el parámetro "B", fue significativamente inferior cuando las muestras se incubaron en el medio N<sup>+</sup>. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas ni en el parámetro "A", ni en el parámetro "c".

La evolución de la tasa de producción de gas a lo largo del tiempo de incubación se representa en la figura 2. Se puede apreciar que la tasa de producción de gas fue mayor en el medio N<sup>+</sup>, siendo estas diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) durante las primeras 36 h de incubación. Así mismo, se observó que

Tabla 3. Medias, error estándar (s.e.) y significación (P) de los parámetros del ajuste de la producción acumulada de gas (A, B, c, RM)<sup>1</sup> utilizando un medio de cultivo suplementado en N (N<sup>+</sup>) o no (N<sup>-</sup>)  
 Table 3. Means, standard error (s.e.) and level of significance (P) for the cumulative gas production parameters (A, B, c, RM)<sup>1</sup> with a supplemented (N<sup>+</sup>) or non supplemented (N<sup>-</sup>) with nitrogen culture medium

|       | Parámetros                |                |                |                |                |      |                |                       |                |
|-------|---------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------|----------------|-----------------------|----------------|
|       | A (ml g <sup>-1</sup> MO) |                | B (h)          |                |                | c    |                | RM (h <sup>-1</sup> ) |                |
|       | N <sup>+</sup>            | N <sup>-</sup> | N <sup>+</sup> | N <sup>-</sup> | N <sup>+</sup> |      | N <sup>-</sup> | N <sup>+</sup>        | N <sup>-</sup> |
| Media | 269,5                     | 267,4          | 16,7           | 23,1           | 1,43           |      | 1,51           | 0,0521                | 0,0366         |
| P     | ns                        |                | ***            |                |                | ns   |                | ***                   |                |
| s.e.  | 29,6                      |                | 4,6            |                |                | 0,22 |                | 0,0102                |                |

<sup>1</sup> A: producción potencial de gas; B: tiempo necesario para que se alcance el 50% de la producción potencial de gas; c: parámetro adimensional que define la forma de la curva; RM: tasa de producción de gas máxima.

MO: materia orgánica.

s.e.: error estándar.

ns:  $P > 0,05$ ; \*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ .

la tasa de producción de gas máxima (RM) fue significativamente mayor en el medio N<sup>+</sup> (0,0521 vs. 0,0366 h<sup>-1</sup>;  $P < 0,001$ ).

Por otra parte, esta RM ocurrió antes en el tiempo (9,0 vs. 14,3 h;  $P < 0,001$ ) cuando se utilizó el medio de cultivo N<sup>+</sup> que cuando se utilizó el N<sup>-</sup>. Una vez superados estos máximos, la tasa de producción de gas se redujo de forma más marcada en el caso del medio N<sup>+</sup>, de manera que a partir de las 36 h de incubación ya no se detectaron diferencias significativas en las tasas de producción de gas.

Relación de la producción de gas obtenida utilizando un medio suplementado con nitrógeno (N<sup>+</sup>) o no (N<sup>-</sup>) con la composición química y la DMO

Los coeficientes de correlación entre los parámetros del ajuste de la producción de gas utilizando los medios de cultivo N<sup>+</sup> y N<sup>-</sup>, con la DMO y la composición química de los ensilados de hierba se resumen en la tabla 4. Tal y como se aprecia, cuando se utilizó el medio N<sup>-</sup> no se encontraron correlaciones individuales significativas entre el parámetro



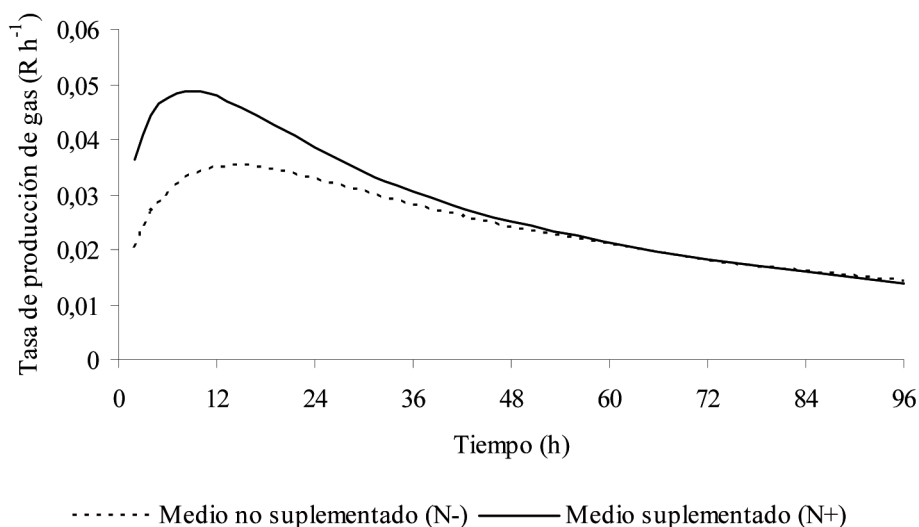


Figura 2. Evolución de la tasa de producción de gas (R) con el tiempo de incubación utilizando un medio suplementado con N (N<sup>+</sup>) o no (N<sup>-</sup>).

Figure 2. Gas production rate (R) evolution with incubation time using a supplemented (N<sup>+</sup>) or non supplemented (N<sup>-</sup>) with nitrogen culture medium.

"A", o el parámetro "c", y ninguno de los parámetros químicos (FND, FAD, CEL, LAD, PB) o la DMO. Por el contrario, las correlaciones fueron significativas con el parámetro "B". Estas correlaciones fueron positivas para el contenido en FND, FAD, CEL y LAD, y negativas para el contenido en PB y la DMO. Además, excepto para el contenido en LAD y CEL, se puede considerar que las correlaciones encontradas fueron altas ( $r > 0,70$ ).

Al considerar los parámetros obtenidos con el medio de cultivo N<sup>+</sup>, los parámetros "A" y "c" presentaron correlaciones significativas con el contenido en PB, de signo negativo para "A" y positivo para "c". En cualquier caso, ambas correlaciones fueron bajas ( $r < 0,50$ ). El parámetro "B" presentó correlaciones significativas tanto con los parámetros de composición química como con la DMO. Las correlaciones presentaron valores absolutos que oscilaron entre 0,61 y 0,85, a excepción de la correlación correspondiente al contenido

en LAD, para el que se alcanzaron valores inferiores a 0,50. De cualquier manera, las correlaciones encontradas con el parámetro "B" fueron ligeramente superiores con el medio de cultivo N<sup>+</sup>, excepto en el caso del contenido en LAD (tabla 4).

La tasa de producción de gas máxima obtenida con ambos tipos de medio, se encontró significativamente correlacionada con los parámetros de composición química y con la DMO. En ambos casos, las correlaciones fueron positivas con el contenido en PB y con la DMO, y negativas con los parámetros químicos relacionados con el contenido en pared vegetal (FND, FAD, CEL, LAD). También en este caso, las correlaciones obtenidas fueron ligeramente superiores para el medio N<sup>+</sup>, excepto para la observada con el contenido en LAD (tabla 4).

La evolución de la correlación entre la tasa de producción de gas y la DMO a lo largo del periodo de incubación puede observarse

Tabla 4. Coeficientes de correlación entre los parámetros del ajuste de la producción de gas (A, B, c, RM)<sup>1</sup> utilizando un medio de cultivo suplementado en N (N<sup>+</sup>) o no (N<sup>-</sup>), y la digestibilidad aparente de la materia orgánica o la composición química<sup>2</sup>

Table 4. Correlation coefficients obtained between gas production parameters (A, B, c, RM)<sup>1</sup> with a supplemented (N<sup>+</sup>) or non supplemented (N<sup>-</sup>) with nitrogen culture medium and apparent digestibility or the chemical composition<sup>2</sup>

|     | Parámetros          |                     |                      |                      |                     |                     |                      |                      |
|-----|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
|     | A                   |                     | B                    |                      | c                   |                     | RM                   |                      |
|     | N <sup>+</sup>      | N <sup>-</sup>      | N <sup>+</sup>       | N <sup>-</sup>       | N <sup>+</sup>      | N <sup>-</sup>      | N <sup>+</sup>       | N <sup>-</sup>       |
| FND | 0,25 <sup>ns</sup>  | 0,24 <sup>ns</sup>  | 0,85 <sup>***</sup>  | 0,80 <sup>***</sup>  | 0,02 <sup>ns</sup>  | 0,16 <sup>ns</sup>  | -0,75 <sup>**</sup>  | -0,73 <sup>***</sup> |
| FAD | -0,23 <sup>ns</sup> | -0,28 <sup>ns</sup> | 0,74 <sup>***</sup>  | 0,70 <sup>***</sup>  | 0,06 <sup>ns</sup>  | 0,27 <sup>ns</sup>  | -0,71 <sup>***</sup> | -0,65 <sup>***</sup> |
| CEL | 0,12 <sup>ns</sup>  | 0,06 <sup>ns</sup>  | 0,70 <sup>***</sup>  | 0,61 <sup>**</sup>   | 0,19 <sup>ns</sup>  | 0,36 <sup>ns</sup>  | -0,54 <sup>**</sup>  | -0,46 <sup>*</sup>   |
| LAD | -0,21 <sup>ns</sup> | -0,19 <sup>ns</sup> | 0,45 <sup>*</sup>    | 0,49 <sup>*</sup>    | -0,18 <sup>ns</sup> | -0,10 <sup>ns</sup> | -0,44 <sup>*</sup>   | -0,52 <sup>**</sup>  |
| PB  | -0,49 <sup>*</sup>  | -0,40 <sup>ns</sup> | -0,79 <sup>***</sup> | -0,71 <sup>***</sup> | 0,41 <sup>*</sup>   | 0,18 <sup>ns</sup>  | 0,82 <sup>***</sup>  | 0,78 <sup>***</sup>  |
| DMO | 0,05 <sup>ns</sup>  | 0,08 <sup>ns</sup>  | -0,77 <sup>***</sup> | -0,72 <sup>***</sup> | 0,34 <sup>*</sup>   | 0,11 <sup>ns</sup>  | 0,75 <sup>***</sup>  | 0,72 <sup>***</sup>  |

<sup>1</sup> A: producción potencial de gas; B: tiempo necesario para que se alcance el 50% de la producción potencial de gas; c: parámetro adimensional que define la forma de la curva; RM: tasa máxima de producción de gas.

<sup>2</sup> FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; CEL: celulosa; LAD: lignina ácido detergente; PB: proteína bruta; DMO: digestibilidad aparente de la materia orgánica.

ns:  $P > 0,05$ ; \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

en la figura 3. En el caso del medio de cultivo N<sup>+</sup>, esta correlación aumentó desde las primeras horas de incubación alcanzando su máximo ( $r = 0,85$ ) a las 12 h tras la inoculación, para disminuir a partir de este máximo. En el caso del medio N<sup>-</sup> la evolución fue similar, si bien las correlaciones fueron inferiores a las obtenidas con el medio N<sup>+</sup> a lo largo de todo el periodo de incubación, obteniéndose la correlación máxima ( $r = 0,75$ ) más tarde en el tiempo, a las 15 h del comienzo de la incubación.

Estimación de la DMO a partir de los parámetros de ajuste obtenidos utilizando medio suplementado (N<sup>+</sup>) y no suplementado con nitrógeno (N<sup>-</sup>)

Las ecuaciones de predicción de la DMO de los ensilados de hierba, utilizando los parámetros del ajuste de la curva de producción

de gas obtenidos con medios de cultivo N<sup>+</sup> y N<sup>-</sup> pueden verse en la tabla 5. Tal y como se aprecia, al utilizar los parámetros obtenidos con el medio de cultivo N<sup>+</sup>, el procedimiento por tramos hacia delante llevó a considerar al conjunto de parámetros de la curva de ajuste (A, B y c), obteniéndose una ecuación con un elevado coeficiente de determinación ( $r^2 = 0,758$ ) y un error de predicción (d.e.r. = 43,21 g kg<sup>-1</sup>) equivalente al 6,5% de la DMO media.

Por el contrario, al considerar los parámetros obtenidos del ajuste de la curva de producción de gas con el medio de cultivo N<sup>-</sup>, el procedimiento por tramos hacia delante, únicamente incluyó el parámetro "B". El coeficiente de determinación obtenido en este caso fue 0,519 y el error de predicción encontrado 58,09 g kg<sup>-1</sup>, lo que equivale al 8,7% de la DMO media (tabla 5).

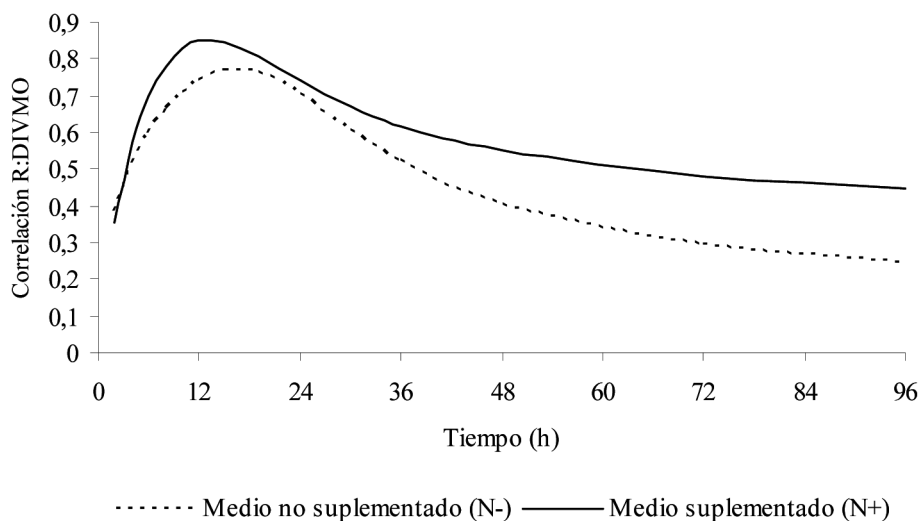


Figura 3. Evolución de la correlación entre la tasa de producción de gas (R) obtenida utilizando un medio de cultivo suplementado (N<sup>+</sup>) o no (N<sup>-</sup>) con la digestibilidad aparente (DMO) a lo largo del tiempo de incubación.

*Figure 3. Evolution with incubation time of the correlation between gas production rate (R) obtained using a supplemented (N<sup>+</sup>) or non supplemented (N<sup>-</sup>) with nitrogen culture medium and apparent digestibility (DMO).*

Tabla 5. Ecuaciones de predicción de la digestibilidad aparente de la materia orgánica utilizando los parámetros resultantes del ajuste de la producción de gas (A, B, c)<sup>1</sup> obtenidas en medio suplementado (N<sup>+</sup>) o no (N<sup>-</sup>) con nitrógeno

*Table 5. Predictive equations of the organic matter apparent digestibility using gas production parameters (A, B, c) obtained with a supplemented (N<sup>+</sup>) or non supplemented (N<sup>-</sup>) with nitrogen culture medium*

|                            | Intercepto | A (ml g <sup>-1</sup> MO) | B (h)  | c      | r <sup>2</sup> | d.e.r. (g kg <sup>-1</sup> ) |
|----------------------------|------------|---------------------------|--------|--------|----------------|------------------------------|
| Medio suplementado en N    | 475,7      | 0,85                      | -15,99 | 155,79 | 0,758          | 43,21                        |
| Medio no suplementado en N | 942,61     |                           | -12,25 |        | 0,519          | 58,09                        |

<sup>1</sup> A: producción potencial de gas; B: tiempo necesario para que se alcance el 50% de la producción potencial de gas; c: parámetro adimensional que define la forma de la curva.

r<sup>2</sup>: coeficiente de determinación; d.e.r.: desviación estándar de los residuos.

## Discusión

La curva de producción de gas obtenida de la incubación *in vitro* de un alimento, depende tanto de la naturaleza del propio alimento, como de las características del medio de cultivo utilizado en la fermentación, o de las condiciones en las que ésta se desarrolla (Rymer et al., 1999). No obstante, en el caso de la valoración de alimentos, lo que se pretende es que la producción de gas sea lo más independiente posible de las características del ensayo, y que esté condicionada en la medida de lo posible por las características del alimento analizado.

En el presente estudio se encontraron diferencias notables en la producción de gas obtenida al incubar las muestras de ensilado de hierba en un medio de cultivo N<sup>+</sup> o N<sup>-</sup> (figuras 1 y 2). Estas diferencias conllevan que el ajuste de la producción de gas resulte en ecuaciones claramente diferenciadas, reflejándose especialmente en el tiempo necesario para que se alcance la mitad de la producción potencial de gas (B) (figura 1), y en la tasa máxima de producción de gas (RM), junto con el tiempo necesario para alcanzarla ( $t_{RM}$ ) (figura 2). Estas diferencias podrían ser debidas a que en el medio de cultivo N<sup>-</sup>, la actividad potencial de los microorganismos se vería limitada negativamente por un posible déficit de N, reflejándose, de forma general, en una menor tasa de producción de gas (Krisnamoorthy et al., 1991).

En condiciones de déficit de nitrógeno en relación a la disponibilidad de hidratos de carbono, como puede ser el caso al utilizar un medio de cultivo no suplementado con N, los microorganismos tenderían a adoptar estrategias para reducir la producción de ATP (Russell, 1998) y disipar energía disponible (Russell y Strobel, 1993), ya que un exceso de ATP podría resultarles tóxico. Entre las alternativas disponibles, estaría el empleo de rutas metabólicas que producen lactato en lugar de acetato (Russell, 1998), y el empleo

directo de hidratos de carbono para sintetizar mucílago o polímeros de  $\alpha$ -dextrinas (McAllan y Smith, 1976). Todo ello se traduciría en una reducción de la tasa de producción de gas, al ser ésta un reflejo del proceso fermentativo, en particular de la producción de ácidos grasos volátiles y ATP (Harrison et al., 1979), y explicaría las diferencias entre medios de cultivo observadas en la figura 2.

Estos resultados estarían en línea con los de Dryhurst y Wood (1998), quienes describieron que la limitación en la disponibilidad de nitrógeno causaba, básicamente, una disminución de la cinética de producción de gas, sin afectar a la producción potencial.

Si consideramos, que al inicio del periodo de incubación la proteína del alimento es poco disponible para los microorganismos, éstos harían uso, principalmente, del N aportado por el medio de cultivo y el inóculo ruminal. En el caso del medio suplementado ambos aportarían una cantidad de N equivalente a una concentración de 233 mg de N l<sup>-1</sup>, frente a 105,4 mg de N l<sup>-1</sup> en el caso del medio N<sup>-</sup>. Es decir, el N utilizable representaría el 2,2% y el 1,0% de la materia seca del substrato incubado, para los medios de cultivo N<sup>+</sup> y N<sup>-</sup> respectivamente. Por lo tanto, al comienzo del periodo de incubación, mientras que en el medio de cultivo N<sup>-</sup> la cantidad de N disponible se sitúa en el límite inferior de las necesidades para no limitar la fermentación ruminal (1-1,2% de N sobre materia seca incubada) establecidas por Van Soest (1994), en el medio de cultivo N<sup>+</sup> se encuentra 1,8 veces por encima del límite superior del rango establecido por este autor.

Para ensayos *in vitro*, en la bibliografía se encuentran estudios en los que se evalúan las necesidades en nitrógeno de los microorganismos, que permiten tasas máximas de degradación de los alimentos. Así, Oosting et al. (1989) utilizando una metodología *in vitro* discontinua observaron que para alcanzar la máxima degradación *in vitro* se

requería entre 88 y 100 mg N l<sup>-1</sup>, valores inferiores a los que permitieron la mayor tasa de producción de gas en el caso presente. Junto a las características del fermentador, la mayor digestibilidad de los alimentos utilizados en el presente ensayo, en relación a los empleados por Oosting et al. (1989), podría haber contribuido a que las concentraciones de N necesarias, para alcanzar una tasa de fermentación óptima, hayan sido más elevadas, ya que las necesidades en nitrógeno son tanto más altas cuanto que la degradabilidad del alimento es mayor (Erdman et al., 1986).

Esta mayor disponibilidad de nitrógeno al utilizar el medio de cultivo N<sup>+</sup>, 2,2 veces mayor al comienzo de la incubación, se amortiguaría a medida que aumente la disponibilidad del N de la dieta. Considerando el aporte medio de N de los ensilados, la mayor disponibilidad de N al utilizar el medio de cultivo N<sup>+</sup>, se reduciría, por término medio hasta 1,5 veces. Esto explicaría que en períodos posteriores, en particular después de alcanzar la tasa de producción máxima, se encuentre una menor disminución de la tasa de producción de gas al utilizar el medio N<sup>-</sup>, resultando en un patrón de fermentación más homogéneo (figura 2), y contribuyendo a la similitud de producción potencial de gas (A) con ambos medios de cultivo (figura 1).

La influencia que el N disponible tiene sobre la cinética de degradación, se traduce, igualmente, a la correlación de los parámetros de producción de gas con los parámetros de la analítica química y con la DMO, así como en los resultados de la regresión entre los parámetros de producción de gas y la DMO. Al utilizar los datos obtenidos en los ensayos con el medio N<sup>+</sup>, se obtuvieron mejores correlaciones y una mejor estima de la DMO, lo que reflejaría una mayor independencia de las condiciones de trabajo. Por lo tanto, la incubación en un medio suplementado con N estaría reflejando mejor el proceso de degradación *in vivo*, independien-

temente de que en éste los animales no recibían ningún aporte externo de N.

En condiciones *in vivo*, los microorganismos, además del aporte de nitrógeno de la ración, cuentan con aportes de urea endógena, transferida al rumen a través de la saliva (McDonald, 1948), que puede suplir el déficit existente cuando el aporte dietético es inferior a sus necesidades.

La menor capacidad de predicción que resulta al utilizar un medio de cultivo N<sup>-</sup> se encontraría en contraposición por lo observado por Menke et al. (1979), quienes encontraban ecuaciones de predicción muy precisas utilizando medio de cultivo no suplementado. El mayor contenido en PB de los alimentos incubados (203,0 vs. 142,2 g kg<sup>-1</sup>), respecto a los del presente ensayo, así como el empleo de un inóculo más concentrado (1:2 vs. 1:4), podrían explicar estas diferencias. Además, Menke et al. (1979) junto a la producción de gas a las 24 h de incubación, utilizó como variables independientes los contenidos en PB, grasa y los extractivos libres de nitrógeno, lo que contribuiría a mejorar la bondad de la predicción de las ecuaciones propuestas.

## Conclusiones

La cantidad de nitrógeno aportado por el inóculo bacteriano y el ensilado de hierba no fue suficiente para mantener un óptimo crecimiento microbiano. Esto contribuyó a que las correlaciones encontradas entre los parámetros obtenidos del ajuste de la curva de producción de gas tanto con la composición química y la digestibilidad aparente de la materia orgánica, fueran inferiores cuando el medio de cultivo no fue suplementado con nitrógeno, traduciéndose en mejores ecuaciones de predicción de la digestibilidad al utilizar el medio de cultivo suplementado con nitrógeno.

## Bibliografía

- Dryhurst N, Wood CD, 1998. The effect of nitrogen source and concentration on *in vitro* gas production using rumen micro-organisms. *Anim. Feed Sci. Technol.* 71, 131-143.
- Dulphy JP, Demarquilly C, 1981. Problèmes particuliers aux ensilages, *En: Prévission de la valeur nutritive des aliments des ruminants*, INRA editions, Paris, Francia, pp. 81-104.
- Erdman RA, Proctor GH, Vandersall JH, 1986. Effect of rumen ammonia concentration on *in situ* rate and extent of digestion of feedstuffs. *J. Dairy Sci.* 69, 2312-2320.
- García-Rodríguez A, Mandaluniz N, Flores G, Oregui LM, 2005. A gas production technique as a tool to predict organic matter digestibility of grass and maize silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 267-276.
- Goering MK, Van Soest PJ, 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications), *Agriculture Handbook*, Vol 379, Agricultural Research Service, USDA, Washington, EEUU.
- Groot JCJ, Cone JW, Williams BA, Debersaques, FMA, Latinga EA, 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics on *in vitro* ruminal fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64, 77-89.
- Harrison DG, Beever DE, Osbourne DF, 1979. The contribution of protozoa to the protein entering the duodenum of sheep. *Br. J. Nutr.* 41, 521-527.
- Khazaal K, Dentinho MT, Ribeiro JM, Orskov ER, 1993. A comparison of gas production during incubation with rumen contents *in vitro* and nylon bag degradability as predictors of the apparent digestibility *in vivo* and the voluntary intake of hays. *Anim. Prod.* 57, 105-112.
- Krisnamoorthy U, Soller H, Steingass H, Menke KH, 1991. A comparative study on rumen fermentation of energy supplements *in vitro*. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 65, 28-35.
- Mapa 1995. Métodos oficiales del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). BOE 52, 7167.
- McAllan AB, Smith RH, 1976. Effect of dietary nitrogen source on carbohydrate metabolism in the rumen of the young steer. *Br. J. Nutr.* 36, 511-522.
- McDonald IW, 1948. The absorption of ammonia from the rumen of sheep. *Biochem. J.* 42, 584-587.
- McDougall EI, 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43, 99-109.
- Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W, 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci. (Camb)*. 93, 217-222.
- Oosting SJ, Verdonk JM, Spinhoven GGB, 1989. Effect of supplementary urea, glucose and minerals on the *in vitro* degradation of low quality feeds. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2, 583-590.
- Russell JB, 1998. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. *J. Anim. Sci.* 76, 1955-1963.
- Russell JB, Strobel HJ, 1993. Microbial energetics, *En: Forbes, J.M., France, J. (Eds.), Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*, CABI, Wallingford, Reino Unido, pp. 165-186.
- Rymer C, Huntington JA, Givens DI, 1999. Effects of inoculum preparation method and concentration, method of inoculation and pre-soaking the substrate on the gas production profile of high temperature dried grass. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78, 199-213.
- SAS, 2002. SAS/Stat User's Guide, Cary, NC, EEUU.
- Van Soest PJ, 1994. Nutritional Ecology of the Ruminants. Cornell University Press, Ithaca, Nueva York, EEUU.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA, 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583-3597.
- Weatherburn MW, 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Ann. Chem.* 39, 971-974.

(Aceptado para publicación el 27 de abril de 2010)



**PREMIOS DE PRENSA AGRARIA 2010  
DE LA  
ASOCIACIÓN INTERPROFESIONAL  
PARA EL DESARROLLO AGRARIO**

La Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (AIDA) acordó en Asamblea General celebrada en mayo de 1983, instaurar un premio anual de Prensa Agraria, con el objetivo de hacer destacar aquel artículo de los publicados en ITEA que reúna las mejores características técnicas, científicas y de valor divulgativo, y que refleje a juicio del jurado, el espíritu fundacional de AIDA de hacer de transmisor de conocimientos hacia el profesional, técnico o empresario agrario. Se concederá un premio, pudiendo quedar desierto.

Los premios se regirán de acuerdo a las siguientes

**BASES**

1. Podrán concursar todos los artículos que versen sobre cualquier tema técnico-económico-agrario.
2. Los artículos que podrán acceder al premio serán todos aquellos que se publiquen en ITEA en el año 2010. Consecuentemente, los originales deberán ser enviados de acuerdo con las normas de ITEA y aprobados por su Comité de Redacción.
3. El jurado estará constituido por las siguientes personas:
  - a) Presidente de AIDA, que presidirá el jurado.
  - b) Director de la revista ITEA, que actuará de Secretario.
  - c) Director Gerente del CITA (Diputación General de Aragón).
  - d) Director del Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza.
  - e) Director de la Estación Experimental de Aula Dei.
  - f) Director del Instituto Pirenaico de Ecología.
4. El premio será anual y tendrá una dotación económica.
5. Las deliberaciones del jurado serán secretas, y su fallo inapelable.
6. El fallo del jurado se dará a conocer en la revista ITEA, y la entrega del premio se realizará con motivo de la celebración de las Jornadas de Estudio de AIDA.



CIHEAM

CENTRO INTERNACIONAL DE ALTOS ESTUDIOS AGRONÓMICOS MEDITERRÁNEOS  
INSTITUTO AGRONÓMICO MEDITERRÁNEO DE ZARAGOZA

CIHEAM/IAMZ - Cursos 2009-10-11

|                    | CURSOS   | FECHAS                | LUGAR                  | ORGANIZACIÓN                                   |
|--------------------|--|-----------------------|------------------------|--|
| PRODUCCIÓN VEGETAL | * OLIVICULTURA Y ELAIOTECNIA   | 25 Sep. 09/26 Mayo 10 | Córdoba                | UCO/JA/CSIC/COI/<br>INIA/IAMZ                  |
|                    | SALINIDAD DE SUELOS EN LOS SISTEMAS AGRARIOS:<br>IMPACTO Y GESTIÓN                         | 26-31 Oct. 09         | Zaragoza               | IAMZ/UE-Proyecto<br>Qualiwater                 |
|                    | ALIMENTOS FUNCIONALES: BASES CIENTÍFICAS Y<br>OPORTUNIDADES PARA EL SECTOR AGROALIMENTARIO | 15-19 Feb. 10         | Zaragoza               | IAMZ/Proyecto<br>Consolider Fun-C-Food         |
|                    | APLICACIONES DE LA BIOINFORMÁTICA EN<br>MEJORA VEGETAL                                     | 12-16 Abr. 10         | Zaragoza               | IAMZ   |
|                    | * MEJORA GENÉTICA VEGETAL  | 4 Oct. 10/10 Jun. 11  | Zaragoza               | IAMZ/UdL                                       |
| PRODUCCIÓN ANIMAL  | * NUTRICIÓN ANIMAL   | 5 Oct. 09/11 Jun. 10  | Zaragoza               | IAMZ/UZ/FEDNA/<br>UPM                          |
|                    | * MEJORA GENÉTICA ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA<br>DE LA REPRODUCCIÓN                             | 5 Oct. 09/30 Jun. 10  | Valencia/<br>Barcelona | UPV/UAB/IAMZ/<br>IVIA/INIA/IRTA/<br>AGROALIMED |
|                    | PRODUCCIÓN CAPRINA   | 8-19 Nov. 10          | Murcia                 | IAMZ/CAA-CARM                                  |
|                    | CONSERVACIÓN Y GESTIÓN DE RECURSOS<br>GENÉTICOS ANIMALES                                   | 17-21 Ene. 11         | Zaragoza               | IAMZ/FAO                                       |
|                    | APLICACIONES DE LA GENÓMICA EN MEJORA ANIMAL   | 21-25 Mar. 11         | León                   | IAMZ/Univ. León                                |
|                    | PRODUCCIÓN AVÍCOLA EN CLIMAS CÁLIDOS   | 9-13 Mayo 11          | Zaragoza               | IAMZ   |

(\*) **Cursos de Especialización de Postgrado** del correspondiente Programa Master of Science (\*marcados con asterisco en el listado). Se desarrollan cada dos años:

- MEJORA GENÉTICA VEGETAL: 10-11; 12-13; 14-15
- OLIVICULTURA Y ELAIOTECNIA: 09-10; 11-12; 13-14
- NUTRICIÓN ANIMAL: 09-10; 11-12; 13-14
- MEJORA GENÉTICA ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN: 09-10; 11-12; 13-14
- PLANIFICACIÓN INTEGRADA PARA EL DESARROLLO RURAL Y LA GESTIÓN DEL MEDIO AMBIENTE: 10-11; 12-13; 14-15
- MARKETING AGROALIMENTARIO: 09-10; 11-12; 13-14
- ACUICULTURA: 10-11; 12-13; 14-15

Se destinan primordialmente a titulados superiores en vías de especialización de posgrado. No obstante se estructuran en unidades independientes para facilitar la asistencia de profesionales interesados en aspectos parciales del programa. Los participantes que cumplan los requisitos académicos pueden optar a la realización del 2º año para la obtención del Título Master of Science. El plazo de inscripción para los cursos de Mejora genética vegetal, Planificación integrada para el desarrollo rural y la gestión del medio ambiente y Acuicultura finaliza el 4 de Mayo 2010. El plazo de inscripción para el curso de Olivicultura y elaiotecnica finaliza el 15 de Abril 2011. El plazo de inscripción para los cursos de Nutrición animal, Mejora genética animal y biotecnología de la reproducción y Marketing agroalimentario finaliza el 3 de Mayo 2011.

El Estado Español reconoce el título Master of Science del CIHEAM otorgado a través del IAMZ como equivalente al título oficial de Máster del sistema universitario español.

**Los cursos de corta duración** están orientados preferentemente a investigadores y profesionales relacionados en el desarrollo de sus funciones con la temática de los distintos cursos. El plazo de inscripción para los cursos de corta duración finaliza 90 días antes de la fecha de inicio del curso.

**Becas.** Los candidatos de países miembros del CIHEAM (Albania, Argelia, Egipto, España, Francia, Grecia, Italia, Líbano, Malta, Marruecos, Portugal, Túnez y Turquía) podrán solicitar becas que cubran los derechos de inscripción, así como becas que cubran los gastos de viaje y de estancia durante el curso. Los candidatos de otros países interesados en disponer de financiación deberán solicitarla directamente a otras instituciones nacionales o internacionales.

No obstante, en algunos cursos coorganizados con otras instituciones pueden existir becas destinadas a candidatos de algunos países no miembros del CIHEAM. Se recomienda consultar el correspondiente apartado de becas en el folleto informativo que se edita específicamente para cada uno de los cursos programados.

|                            | CURSOS   | FECHAS                | LUGAR                      | ORGANIZACIÓN                          |
|----------------------------|--|-----------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| <b>MEDIO AMBIENTE</b>      | EVALUACIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA DESERTIFICACIÓN Y DE LA VULNERABILIDAD DE LOS SISTEMAS DE USO DEL SUELO     | 28 Sep./3 Oct. 09     | Zaragoza                   | IAMZ/UE-Proyecto DeSurvey             |
|                            | PREDICCIÓN DE LA DESERTIFICACIÓN A MEDIO PLAZO   | 18-23 Ene. 10         | Zaragoza                   | IAMZ/UE-Proyecto DeSurvey             |
|                            | ACUÍFEROS COSTEROS PARA RIEGO Y ABASTECIMIENTO: USO SOSTENIBLE Y ACTUACIONES DE REMEDIACIÓN                | 22-27 Mar. 10         | Zaragoza                   | IAMZ                                  |
|                            | GESTIÓN ADAPTATIVA DE LOS ECOSISTEMAS FORESTALES MEDITERRÁNEOS AL CAMBIO CLIMÁTICO                         | 10-15 Mayo 10         | Zaragoza                   | IAMZ                                  |
|                            | * PLANIFICACIÓN INTEGRADA PARA EL DESARROLLO RURAL Y LA GESTIÓN DEL MEDIO AMBIENTE                         | 4 Oct. 10/10 Jun. 11  | Zaragoza                   | IAMZ/UdL                              |
|                            | ECONOMÍA AMBIENTAL Y DE LOS RECURSOS NATURALES   | 7-18 Feb. 11          | Zaragoza                   | IAMZ                                  |
| <b>COMERCIALIZACIÓN</b>    | * MARKETING AGROALIMENTARIO  | 5 Oct. 09/11 Jun. 10  | Zaragoza                   | IAMZ                                  |
|                            | MARKETING DE PRODUCTOS ECOLÓGICOS  | 18-22 Oct. 10         | Zaragoza                   | IAMZ                                  |
|                            | INCORPORACIÓN DE LA CALIDAD Y LA SEGURIDAD ALIMENTARIA EN LOS PLANES DE MARKETING                          | 4-8 Abr. 11           | Zaragoza                   | IAMZ                                  |
|                            | ESTRATEGIAS DE MARKETING PARA LOS PRODUCTORES AGRARIOS LOCALES   | 13-17 Jun. 11         | Zaragoza                   | IAMZ                                  |
|                            |  |                       |                            |                                       |
| <b>PESCA Y AGRICULTURA</b> | ESTABLECIMIENTO Y GESTIÓN DE ÁREAS MARINAS PROTEGIDAS DE INTERÉS PESQUERO                                  | 8-13 Mar. 10          | Zaragoza                   | IAMZ/MARM-SGM                         |
|                            | NUEVAS PERSPECTIVAS PARA LAS CADENAS DE COMERCIALIZACIÓN EN PESCA ARTESANAL Y ACUICULTURA A PEQUEÑA ESCALA | 26-30 Abr. 10         | Zaragoza                   | IAMZ/FAO/MARM-FROM                    |
|                            | MEJORAS TECNOLÓGICAS EN ARTES DE PESCA PARA UNA GESTIÓN SOSTENIBLE   | 14-18 Jun. 10         | Zaragoza                   | IAMZ                                  |
|                            | * ACUICULTURA  | 18 Oct. 10/31 Mayo 11 | Las Palmas de Gran Canaria | ULPGC/ICCM/IAMZ                       |
|                            | GESTIÓN DE LA SEGURIDAD EN MOLUSCOS BIVALVOS   | 27 Sep./1 Oct. 10     | Santiago de Compostela     | IAMZ/Univ. Santiago de Compostela/FAO |
|                            | CULTIVO DE ALGAS MARINAS: TÉCNICAS, USOS Y PERSPECTIVAS DE DESARROLLO                                      | 22-26 Nov. 10         | Zaragoza                   | IAMZ                                  |
|                            | HERRAMIENTAS PARA EL SEGUIMIENTO Y VIGILANCIA EN LOS SISTEMAS DE CONTROL DE LA PESCA                       | 14-18 Mar. 11         | Zaragoza                   | IAMZ                                  |
|                            | MONITORIZACIÓN DE LOS EFECTOS AMBIENTALES DE LA ACUICULTUR   | 23-27 Mayo 11         | Murcia                     | IAMZ/CAA-CARM                         |
|                            |  |                       |                            |                                       |

**Información e inscripción.** Los folletos informativos de cada curso se editan 6-8 meses antes de la fecha de inicio. Dichos folletos, así como los correspondientes formularios de solicitud de admisión pueden solicitarse a la dirección del IAMZ u obtenerse directamente de la página web:

**Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza**

Avenida de Montañana 1005, 50059 Zaragoza (España)  
 Teléfono +34 976 716000 - Fax +34 976 716001 - e-mail iamz@iamz.ciheam.org  
[www.iamz.ciheam.org](http://www.iamz.ciheam.org)



ASOCIACIÓN INTERPROFESIONAL  
PARA EL DESARROLLO AGRARIO

# itea

Información Técnica Económica Agraria

## CONCESIÓN DEL PREMIO PRENSA AGRARIA 2009 DE AIDA

### **Presidente**

Ricardo Revilla Delgado

### **Vocales**

José Luis Arrúe Ugarte  
Dunixi Gaviña Iturriaga  
José González Bonillo  
Blas Valero Garcés

### **Secretario**

Juan A. Marín Velázquez

Reunido el Jurado del Premio 2009 de Prensa Agraria de AIDA formado por D. Ricardo Revilla Delgado, Presidente de AIDA, D. Dunixi Gaviña Iturriaga, en representación del Director del Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ), D. José Luis Arrúe Ugarte, Director de la Estación Experimental de Aula Dei (CSIC) y D. Blas Valero Garcés, Director del Instituto Pirenaico de Ecología (CSIC), y D. José González Bonillo, Director Gerente del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) que disculpa su asistencia, y actuando como secretario D. Juan A. Marín Velázquez, Director de ITEA, tal como establecen las bases de la convocatoria aprobadas en la Asamblea General de la Asociación celebrada en mayo de 1983, acordó premiar entre los artículos publicados en ITEA durante el año 2009 al siguiente:

**Premio "Prensa Agraria":** "Evaluación de la eficacia del programa de monitorización de las poblaciones de vectores de lengua azul, *Culicoides imicola* Kieffer, 1913 y complejo *Culicoides obsoletus* Meigen, 1818 (Diptera: Ceratopogonidae), en España" siendo sus autores C. Calvete, R. Estrada, M.A. Miranda, R. Del Rio, D. Borrás, L. Garrido, B. Muñoz, L.J. Romero y J. Lucientes.

Zaragoza 14 de Mayo de 2010

**INSCRIPCIÓN EN AIDA**

\* Si desea Ud. pertenecer a la Asociación, rellene la ficha de inscripción así como la carta para la domiciliación del pago de la cuota de asociado y envíelas a AIDA Avda. Montañana 930. 50059 Zaragoza.

El abajo firmante solicita su inscripción como miembro de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario.

Apellidos..... Nombre.....  
Dirección postal .....  
Teléfono .....  
Profesión..... Empresa de trabajo.....  
Área en que desarrolla su actividad profesional .....

CUOTA ANUAL: Firma.

ITEA 40 €

**FORMA DE PAGO:**

- |   |  |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Cargo a cuenta corriente o libreta | <input type="checkbox"/> Cargo a tarjeta |
| <input type="checkbox"/> Cheque bancario                    | <input type="checkbox"/> VISA            |
| Tarjeta número:   | <input type="checkbox"/> MASTERCARD      |

□□□□□□□□□□□□□□□□

Fecha de caducidad:     /

SR. DIRECTOR DE.....

Muy Sr. mío:

Ruego a Vd. se sirva adeudar en la cuenta cte./libreta n.º..... que matengo en esa oficina, el recibo anual que será presentado por la "Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario".

Atentamente,

Firmado:

BANCO O CAJA DE AHORROS: .....

SUCURSAL: .....

DIRECCIÓN CALLE/PLAZA: ..... N.º .....

CÓDIGO POSTAL: .....

POBLACIÓN: .....

