



ETSIA

Escuela Técnica
Superior
de Ingeniería
Agronómica



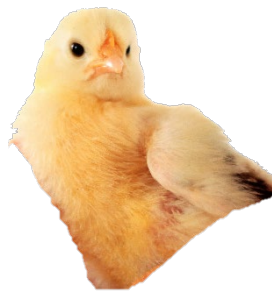
ESCUOLA
INTERNACIONAL DE
DOCTORADO

WiA:23



Universidad
Politécnica
de Cartagena

Libro de actas del 12^o Workshop en Investigación Agroalimentaria para jóvenes investigadores



edicionesUPCT

Libro de actas del 12^o
Workshop en Investigación
Agroalimentaria para
jóvenes investigadores



Agradecimientos

El Comité Organizador agradece a la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica -ETSIA- y al Instituto de Biotecnología Vegetal -IBV- de la Universidad Politécnica de Cartagena -UPCT- su ayuda para hacer posible este evento. También se agradece la financiación recibida de la Escuela Internacional de Doctorado de la UPCT.

©2023 Programa de Doctorado en TAIDA
©2023, Universidad Politécnica de Cartagena

Ediciones UPCT
Plaza del Hospital,1
30202 Cartagena
968325908
ediciones@upct.es

ISBN: 978-84-17853-74-7

Créditos fotos de portada: Francisco Artés Hernández, Eva Armero Ibáñez,
M^a del Carmen Martínez Ballesta.

Comité Científico y Organizador / Editores Técnicos

Dr. Francisco Artés Hernández
Dra. Eva Armero Ibáñez
Dr. Ginés Benito Martínez Hernández
Dr. M^a del Carmen Martínez Ballesta
Dr. Manuel Tornel Martínez

Programa de Doctorado en Técnicas Avanzadas de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (TAIDA). Escuela Internacional de Doctorado (EINDOC). Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT)

<https://estudios.upct.es/doctorado/3470/inicio>



Esta obra está bajo una licencia de Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada (by-nc-nd): no se permite el uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.
http://es.creativecommons.org/blog/wp-content/uploads/2013/04/by-nc-nd.eu_petit.png

Prefacios

Como presidente del Comité Científico y Organizador del 12º Workshop en Investigación Agroalimentaria para jóvenes investigadores (WIA2023), y Coordinador del Programa de Doctorado en Técnicas Avanzadas de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (TAIDA), quiero resaltar la excelencia de las contribuciones realizadas en el evento. Se pone de manifiesto una vez más, la gran calidad de los avances científicos que están realizando nuestros doctorandos. El WIA2023 se celebró presencialmente el 9 de mayo de 2023 en la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica de la Universidad Politécnica de Cartagena. Contó con más de 70 asistentes, que pudieron conocer de mano de 36 doctorandos sus principales avances en las investigaciones desarrolladas en el último año.

Particularmente interesante resultó la ponencia invitada a cargo del Prof. Dr. José Manuel López Nicolás de la Universidad de Murcia quien, gracias a su dilatada experiencia y prestigio, ofreció valiosas recomendaciones para una eficaz divulgación de los resultados científicos que están obteniendo los doctorandos del programa. Las presentaciones orales de los trabajos de investigación, realizadas por los doctorandos de segundo año en adelante, mostraron un elevado interés científico y revelaron el importante potencial de los Equipos de Investigación involucrados en el Programa de doctorado. Los planes de investigación presentados por los doctorandos de primer año vislumbran un prometedor horizonte cercano de avances científicos en el sector de la agroalimentación. Desde la Comisión Académica del Programa TAIDA, consideramos que es muy necesario para los doctorandos en este tipo de eventos científicos, adquirir la capacidad de resumir y difundir sus resultados a un público diverso en un tiempo limitado, incluso en estas incipientes etapas investigadoras de su carrera. Volver a la presencialidad en esta 12º edición de este Workshop propio en nuestro programa ha permitido que los investigadores en formación pudieran interactuar entre sí en busca de sinergias y posible cooperación entre Grupos de Investigación que puedan repercutir en la mejora de sus futuras investigaciones.

Prof. Dr. Francisco Artés Hernández

Coordinador del 12º Workshop en Investigación Agroalimentaria (WIA2023)

Universidad Politécnica de Cartagena, España

En esta nueva edición del Workshop en Investigación Agroalimentaria (WIA) organizado por el Programa de Doctorado de la UPCT en 'Técnicas Avanzadas de Investigación y Desarrollo Agroalimentario' (TAIDA), donde han participado sus investigadores y doctorandos, se ha alcanzado uno de los principales objetivos perseguidos en la formación de los doctores: ser capaces de transmitir sus avances en investigación a otros investigadores de su área de conocimiento. La ponencia impartida por el Prof. Dr. José Manuel López Nicolás, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Murcia, titulada 'Claves para una difusión eficaz de los resultados científicos' ha sido muy bien acogida por los asistentes y les ha permitido valorar significativamente el impacto no sólo de lo que se transmite sino también de cómo se transmite. En esta edición se ha vuelto a realizar una puesta en escena similar al concurso Tesis en 3 minutos que organiza anualmente la EINDOC para todos los doctorandos de la universidad y con el mismo objetivo, que sean capaces de sintetizar en un breve espacio de tiempo en qué consisten sus planes de investigación. Ocho estudiantes participaron y fueron capaces de sintetizar el alcance de sus investigaciones utilizando un vocabulario no técnico. Veintinueve comunicaciones orales de los doctorandos del programa en las distintas líneas de investigación ocuparon la mayor parte de la jornada.

Una vez más, el WIA puso de manifiesto la utilidad de recibir 'feedback' sobre el trabajo que están realizando, muy útil como aportación de ideas y sugerencias para mejorar el trabajo de investigación desde la perspectiva de personas cercanas a la temática, pero estrechamente vinculadas al trabajo de los doctorandos. Las aportaciones de los doctorandos son prueba del alto nivel científico de las tesis doctorales que se están realizando en el marco del citado programa de doctorado. En definitiva, el WIA se ha convertido en una excelente oportunidad para que los doctorandos del Programa de Doctorado TAIDA mantengan fructíferas discusiones y difundan sus logros, al tiempo que ha representado una exitosa experiencia que seguramente inspirará al resto de programas de doctorado de la universidad. Me gustaría dar las gracias a la Comisión Académica del Programa TAIDA dirigido por el Prof. Dr. Francisco Artés Hernández, a los doctorandos y a sus supervisores por su excelente trabajo. El entusiasmo mostrado por los doctorandos durante el taller es para sus organizadores el mejor estímulo para continuar con esta iniciativa.

Prof. Dr. Pedro Sánchez Palma

Director de la Escuela Internacional de Doctorado - EINDOC

Universidad Politécnica de Cartagena, España

PRÓLOGO

El decálogo de la divulgación científica

La Transferencia del Conocimiento es la tercera misión de las universidades. Aunque no es tan conocida como la Investigación y la Docencia (las otras dos misiones de la máxima institución académica), la Transferencia del Conocimiento es un motor de desarrollo social, sanitario y económico imprescindible en cualquier sociedad del siglo XXI.

Hasta hace unos años la Transferencia siempre se asociaba al sector productivo, ya que está relacionada con el desarrollo de nuevos productos, de patentes, de spin-off, etc. Esta Transferencia del saber generado en los laboratorios de las universidades al tejido empresarial sigue siendo una pieza clave en la relación universidad-empresa, pero jamás deberíamos olvidar que la clave del éxito de la transferencia al sector empresarial reside en la investigación básica. Pero desde hace poco tiempo la Transferencia del Conocimiento se dirige también a otros dos sectores: a los gobiernos y administración pública para la toma de decisiones basadas en evidencias; a la sociedad a través de la divulgación científica, una labor con la que estoy fuertemente comprometido desde hace más de una década. Centrémonos en este tercer pilar del concepto moderno de Transferencia del Conocimiento: la divulgación científica.

¿Qué puede conseguir un investigador divulgando sus resultados de investigación? Los resumiré en este *decálogo*:

1. Elevar la cultura científica de la ciudadanía promoviendo una sociedad que apueste por el conocimiento.
2. Poner en valor el papel que la ciencia y la tecnología juegan en nuestra calidad de vida diaria.
3. Entender mejor el mundo que nos rodea.
4. Explicar a la sociedad del uso que damos de sus impuestos.
5. Fomentar vocaciones científicas entre las nuevas generaciones.
6. Combatir las pseudociencias y promover el pensamiento crítico, pero sin hacer de la ciencia un dogma de fe porque, como decía Julio Verne, *"la ciencia se compone de errores, que, a su vez, son los pasos hacia la verdad"*.
7. Aumentar el prestigio social de la ciencia, ya que las actividades de prestigio son más susceptibles de financiación.
8. Estar actualizado de los últimos avances producidos en mi área de conocimiento y en otras afines favoreciendo la investigación interdisciplinar.

9. Difundir los resultados de nuestro grupo de investigación estableciendo relaciones con otros investigadores e instituciones, lo que se traduce en la publicación de artículos científicos en colaboración con nuevos grupos. Comunicar nuestros resultados también ayuda a que el sector productivo conozca nuestras investigaciones, lo que puede dar lugar a contratos con diferentes empresas.
10. Hacernos personas más libres, entendiendo la libertad como la toma de decisiones basadas en el conocimiento y no en mitos, mentiras o falsas creencias.

Prof. Dr. José Manuel López Nicolás

Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular

Universidad de Murcia, España

ÍNDICE

Presentación de los planes de investigación de nuevos doctorandos en el formato 'Tesis en 3 minutos'

SESIÓN ORAL: Tecnología e Ingeniería de Alimentos y Economía

Estudio de la vida útil de los compuestos fenólicos en subproductos vitivinícolas A. Costa-Pérez*, S. Medina, R. Domínguez-Perles, C. García-Viguera	14
Sostenibilidad medioambiental y económica de hortalizas mínimamente procesadas en fresco L. Rasines*, G. San Miguel, E. Aguayo	18
Revalorización del tallo de brócoli mediante la elaboración de un fermentado (encurtido) J. A. Salas-Millán*, A. Conesa-Bueno, E. Aguayo.....	22
Determinación de la calidad funcional en nuevos híbridos de uva de mesa con pulpa tintorer P. Crespo*, M.I. Serrano, L. Martínez-Zamora, F. Artés-Hernández, M. Tornel.....	26
Efecto de la adaptación de <i>Listeria monocytogenes</i> a tratamientos térmicos subletales en su resistencia al calor A. Luciano*, S. Guillén, A. Palop, P.S. Fernández.....	30
Optimización de la extracción de compuestos bioactivos de subproductos de brócoli mediante ultrasonidos H. Seyedehzeinab*, L. Martínez-Zamora, M. Cano-Lamadrid, F. Artés-Hernández.....	34
Caracterización de complejos de inclusión aceites esenciales/ β -ciclodextrina en envases activos A. Navarro-Martínez*, G.B. Martínez Hernández, A. López-Gómez.....	38
Simulación <i>in vitro</i> de la liberación del huésped del complejo de inclusión AOVE- α C Barón-Yusty*, M. Ros-Chumillas, G.B. Martínez-Hernández, A. López-Gómez.....	42
Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de vinagres de alto contenido en ácido acético46 M.A. Martínez-Sánchez*, M. Barón-Yusty, G.B. Martínez-Hernández, A. López-Gómez.....	46
Determinación de los parámetros de inactivación térmica de <i>Lactobacillus</i> spp. mediante aplicación del método de distribución de Weibull50 M.T. Gómez-Hernández*, A. López-Gómez, G.B. Martínez-Hernández	50
Evaluación de una política de internalización de las emisiones de carbono sobre la estructura de cultivos del Campo de Cartagena V. Martínez-García*, J.M. Martínez-Paz, F. Alcón.....	54
Influencia de la pasteurización en el perfil fitoquímico de nuevas bebidas a base de maqui, con diferentes edulcorantes adicionados, durante la producción y conservación	

F.J Salar*, P.M. Periago, P.S. Fernández, C. García-Viguera	58
---	----

SESIÓN ORAL: Tecnología e Ingeniería de la Producción Vegetal

Ácaros astigmátidos como alimento suplementario para razas mejoradas de <i>Orius laevigatus</i> (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae)	
A. Rodríguez-Gómez*, A. Donate , V. Balanza, M.C. Reche, A.B. Abelaira, I. Sánchez-Martínez, P. Bielza	63
Variabilidad de la fecundidad de poblaciones de <i>Orius laevigatus</i> (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) a bajas temperaturas	
A.B. Abelaira*, J.E. Mendoza, I. Sánchez-Martínez, M.C. Reche, V. Balanza, A. Donate, A. Rodríguez-Gómez, P. Bielza	67
Efecto de la desinfección del suelo sobre el cultivo de espinaca baby-leaf (<i>Spinacia oleracea</i>)	
A. Hernández-Lara*, M. Ros, J.A. Pascual.....	71
Ciclo cerrado: aprovechar el drenaje del compost agroindustrial para cultivar hinojo marino (<i>Crithmum maritimum</i> L.) en un sistema flotante	
F. Amoruso*, A. Signore V.M. Gallegos-Cedillo, J. Ochoa, C. Egea-Gilabert, P.A. Gómez, F. Orsini, G. Pennisi, E. Appollonie, J.A. Fernández.....	75
Efecto de la aplicación de fertilizantes inorgánicos y té de compost sobre la diversidad taxonómica y funcional de la rizosfera de verdolaga	
A. Carrascosa*, J. A. Pascual, A. López-García, M. Romo-Vaquero, A. DeSantiago, M. Ros, S. A. Petropoulos, M.M. Alguacil.....	79
Regulación de la actividad sacarolítica en plantas de pimiento en condiciones de estrés salino mediada por el portainjerto	
A. Gálvez*, A. Albacete, F. M del Amor, J. López-Marín	83
Análisis estructural de las vigas del cajón interior de un lisímetro de pesada transportable	
J.A. Nicolás-Cuevas*, M. Soler-Méndez, D. Parras-Burgos, J.M. Molina-Martínez	87
Efecto de biofertilizantes microbianos sobre la fertilidad biológica del suelo y el rendimiento del melón en el sur de España	
I. Ollio*, S. Martínez-Martínez, R. Zornoza, C. Egea-Gilabert, J.A Fernández	90
Estrategia fisiológica dual en plantas de cebolla (<i>Allium cepa</i>) a la salinidad en regiones áridas y semiáridas	
J.A. Berna Sicilia*, A. Solouki, A. Martínez-Alonso, N. Ortiz-Delvasto, G. Barzana y M. Carvajal....	94
Estudio sobre el impacto de la asociación de cultivos entre brócoli y haba en la fertilidad del suelo y la producción	
M. Marcos-Pérez*, V. Sánchez-Navarro, R. Zornoza.....	98
Mitigación del efecto del riego con agua salina sobre la actividad ureasa del suelo mediante bioestimulación	
S. Zapata-García*, P. Berríos, A. Temnani, R. Pérez, P.J. Espinosa-Jiménez, A. Pérez-Pastor	102

Mejora de los parámetros de calidad en frutos del género *Prunus* mediante atomización precosecha foliar de Ca, B y Si

F.J. Quirante-Moya*, M.C. Martínez- Ballesta, M. Carvajal-Alcaráz..... 106

SESIÓN ORAL: Biotecnología Agroalimentaria

Mineralización de carbono y nitrógeno en depósitos de residuos mineros metalíferos restaurados vs. abandonados espontáneamente colonizados por la vegetación como indicador para evaluar la funcionalidad edáfica

M. Ceacero-Moreno*, J. Álvarez-Rogel, M.N González-Alcaraz..... 111

Efectos del medio condicionado para reducción de estrés por cizalla y por dilución en cultivos de células vegetales

F. Verdú-Navarro*, R. Burke, J.A. Moreno-Cid, M. Egea-Cortines, P. McCabe, J. Kacprzyk..... 115

La adopción a largo plazo de labranza reducida y abonos verdes mejora las propiedades fisicoquímicas del suelo y aumenta la abundancia de bacterias beneficiosas en un huerto de almendros de secano mediterráneo

O. Özbolat*, V. Sánchez-Navarro, R. Zornoza, M. Egea-Cortines, J. Cuartero, M. Ros, Jose A. Pascual, C. Boix-Fayos, M. Almagro, J. de Vente, E. Díaz-Pereira, M. Martínez-Mena] 119

Efecto de la selección y el año estación sobre las características de crecimiento de *Sparus aurata*

M. Marín*, A. Vallecillos, E. María Dolores, E. Armero 123

Control genético del quimiotipo en *Cannabis sativa*

A. Gila-Navarro*, J. Weiss, M. Egea-Cortines..... 127

Organizadores



Universidad
Politécnica
de Cartagena

MEMBER OF



EUROPEAN
UNIVERSITY OF
TECHNOLOGY

CEBAS-CSIC

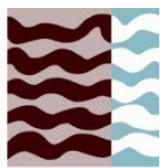
CENTRO DE EDAFOLOGÍA Y BIOLOGÍA APLICADA DEL SEGURA



Instituto Murciano de Investigación y
Desarrollo Agrario y Alimentario



Colaboradores



ETSia
Escuela Técnica

Superior de

Ingeniería

Agronómica



ESCUELA
INTERNACIONAL DE
DOCTORADO



Universidad Politécnica de Cartagena

Presentación de los
planes de
investigación de
nuevos doctorandos
en el formato 'Tesis en
3 minutos'

Presentación divulgativa en 3 minutos de los Planes de Investigación de las Tesis en TAIDA a cargo de los doctorandos de 1º año

Doctorand@	Director/es	Título
Laura Martínez Martínez	Eva Armero Juan Orengo Antonio Vallecillos	Estudio del tipo genético de la gallina murciana sobre la eficiencia productiva, de calidad de canal y de carne
María del Carmen Reche Guillermo	Pablo Bielza	Mejora genética de <i>Macrolophus pygmaeus</i> (Hemiptera: Miridae) como agente de control biológico en cultivos hortícolas
Rachida Rania Benaissa	Juan A. Fernández Perla A. Gómez	Effect of exogeneous melatonin on halophyte species in soilless cultivation
Laleh Mozafari	Francisco Artés Hernández	Tomato by-products revalorization: optimum extraction and uses by carotenes fortification of new food products
Mistral Valenzuela	Francisco Alcón José Ángel Zabala	Adopción de prácticas agrícolas para la sostenibilidad del cultivo de café en República Dominicana
Richard Yudin Fitzherbert	Yuncong Li M ^a Carmen Martínez	Modernizing the rhizosphere quality measurement paradigm. Revision of the "Salt Index" and related standard methods of evaluating the effect of different fertilizers on the soil-water-plant continuum.
Miguel Victoria Sanes	Antonio López Ginés Benito Martínez	Mejora del Proceso de Producción de Ácido Hialurónico de Alto Peso Molecular mediante fermentación usando bacterias GRAS recombinantes
Rosa Zapata Arráez	Francisco Artés Hernández	Revalorización de subproductos cítricos mediante la extracción de compuestos antioxidantes y antimicrobianos e incorporación en matrices alimentarias para mejorar su calidad y seguridad

SESIÓN ORAL:
Tecnología e
Ingeniería de
Alimentos y
Economía

Estudio de la vida útil de los compuestos fenólicos en subproductos vitivinícolas

Study of the shelf-life of phenolic compounds in winery by-products

A. Costa-Pérez*, S. Medina, R. Domínguez-Perles, C. García-Viguera

Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables (LabFAS), Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, CEBAS-CSIC, Campus de la Universidad de Murcia -25, 30100 Espinardo, Murcia, España.

*acosta@cebas.csic.es

Resumen

Los subproductos generados en la elaboración del vino constituyen un problema medioambiental y de gestión para las empresas. Este trabajo busca conseguir las condiciones idóneas, para conservar los compuestos bioactivos de dichos subproductos, con el fin de convertirlos en ingredientes funcionales. Así, se ha conseguido preservar el perfil fitoquímico de los subproductos, en estas matrices desecadas, conservando los compuestos (poli)fenólicos totales en un porcentaje aproximado del 79% en raspón, 83% en lías y 94% en bagazo tras 12 meses de almacenamiento. De este modo, los subproductos estabilizados se podrían emplear como fuente de compuestos fitoquímicos a lo largo de una anualidad.

Palabras clave: Vida útil; subproductos vitivinícolas; raspón; bagazo; lías; valorización.

Abstract

The by-products generated in winemaking constitute an environmental problem, as well as a management problem for companies. This work seeks to achieve the ideal conditions to preserve the bioactive compounds of these by-products in order to convert them into functional ingredients. Thus, it has been possible to preserve the phytochemical profile of the by-products in these dried matrices, conserving the total (poly)phenolic compounds in an approximate percentage of 79% in the stalks, 83% in the lees and 94% in the grape pomace after 12 months storage. Thereby, the by-products stabilized could be used as sources of phytochemical compounds throughout an annuity.

Keywords: Self-life; winery by-products; grape stems; grape pomace; wine lees; valorization.

1. INTRODUCCIÓN

La industria vitivinícola es uno de los sectores agroindustriales más importantes a nivel mundial (1). Su actividad conlleva la generación de grandes cantidades de residuos líquidos y sólidos que requieren tratamientos específicos para reducir el impacto medioambiental de su eliminación. No obstante, como alternativa, dichos materiales podrían ser revalorizados en el marco de nuevos procesos productivos que contribuyeran a diversificar la actividad económica de estas industrias, aumentando la competitividad del sector. En la actualidad, el residuo del despalillado (raspón) y los residuos de prensado u orujo de uva (pulpa, hollejos y semillas) son destinados, en un alto porcentaje, para la elaboración de compost (2), lo cual está asociado a un limitado retorno económico. Sin embargo, con la información disponible en la actualidad acerca de la composición fitoquímica de estos residuos (3), sugiere alternativas de valorización hacia nuevos co-productos con una actividad biológica interesante, resultado del amplio espectro de

compuestos fenólicos presentes. Entre las diferentes opciones de valorización cabe destacar su uso con fines agroalimentarios, nutracéuticos o cosmeceúticos, entre otros. Sin embargo, la producción estacional y el carácter perecedero de estos materiales limita las opciones de valorización. Por tanto, es importante abordar la optimización de las condiciones de procesado, para obtener un producto intermedio estandarizado que preserve su perfil fitoquímico, con el fin de poder ser incorporado en formulaciones de alimentos funcionales. De esta forma, es también importante abordar un seguimiento de la evolución de la estabilidad de los compuestos de interés en los subproductos desecados y almacenados a temperatura ambiente. Lo que permitirá valorar la posibilidad de empleo de dichos materiales, con la garantía de conservar las composiciones fitoquímicas de los diversos residuos de la industria vitivinícola en porcentajes elevados y, por ende, su actividad biológica.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Reactivos químicos

Patrones catequina, ácido 1,4-clorogénico, resveratrol, quercetina-3-O-glucósido y cianidina-3-O-glucósido de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Solventes de grado LC-MS de JT Baker (Phillisburg, NJ, EEUU). Agua ultrapura MilliQ®.

2.2 Material vegetal

Subproductos vitivinícolas desecados (raspón, bagazo y lías) procedentes de uva (*Vitis vinifera* L. var. Monastrell) de Bodegas *Viña Elena S.L.* (Jumilla, España).

2.3 Desecado para la estabilización del material

Gradiente de temperaturas (75-60 °C en 10 horas), diseñado para conservar la composición polifenólica, seguido de un pos-secado a baja temperatura (40 °C), hasta peso constante.

2.4 Determinación del perfil polifenólico cualitativo y cuantitativo por HPLC-PDA-ESI-MSn

Para la extracción de los compuestos bioactivos se agitaron 100 mg de muestra en un 1 ml de una solución MeOH/HCOOH/H₂O (50:2:48, v/v/v), en ultrasonidos durante 60 minutos, después se mantuvieron a 4 °C durante la noche, y se volvieron a someter a ultrasonidos otros 60 min. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10000 × g durante 5 min. El registro de cromatogramas se llevó a cabo a 280 nm para proantocianidinas, 320 nm para ácidos fenólicos y estilbenos, 360 nm para flavonoles y a 520 nm para antocianos (software Agilent Technologies) y se realizó de acuerdo con las especificaciones cromatográficas y de ionización descritas por Barros *et al.* (4).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la aplicación de las condiciones de deshidratación, se tomaron muestras los días 0, 2, 7, 15, 30, 90, 180 y 360, y se conservaron en ultracongelación (-80 °C), para realizar un análisis conjunto, con el fin de evitar variaciones asociadas a la analítica. Transcurridos los 12 meses se comprobó que los subproductos continuaban teniendo las propiedades físicas adquiridas tras su estabilización, no apreciándose modificaciones macroscópicas debidos a un proceso de deterioro.

El análisis de los compuestos fitoquímicos indicó que existía una gran diversidad en cuando a concentración y distribución de los diferentes bioactivos en las distintas matrices (**Figura 1**), siendo la concentración total más del doble en raspón, que en bagazo o lías.

Por otra parte, estos compuestos presentaron una gran estabilidad tras un año de almacenamiento, no existiendo degradaciones importantes, a nivel práctico, excepto en el caso de los antocianos, cuya concentración sí se redujo significativamente a partir del día 15 en el caso de las lías, mientras que se conservaba alrededor del 70% en las otras dos matrices (**Figura 2**). Respecto al resto de familias de (poli)fenoles, cabe destacar que, los que presentaron mayor degradación (36% máximo), fueron los provenientes del raspón, en el caso de los ácidos fenólicos,

flavonoles y estilbenos. Estos resultados son coincidentes con descripciones previas en la literatura (5), indicando que la estabilización de estos subproductos mantiene en una elevada proporción la composición polifenólica responsable de la posible capacidad antioxidante y antiinflamatoria, que se atribuye a los subproductos de la industria vitivinícola y que constituye el respaldo teórico para potenciales valorizaciones en el marco de las industrias alimentarias, cosméticas y de nutracéuticos.

Por otro lado, señalar que el análisis del impacto del procesado sobre los distintos tipos de compuestos fenólicos de los productos intermedios estabilizados determinó un aumento del contenido en procianidinas como resultado de un efecto de procesado de entre 7,2 y 330 en variación de la concentración dependiendo de la matriz, siendo el bagazo el subproducto que mostró este comportamiento de forma más clara. Este resultado puede atribuirse a condiciones de desecado más severas, lo cual sugiere que durante la estabilización podrían producirse reacciones de polimerización responsables de los aumentos detectados (6).

4. CONCLUSIONES

La aplicación de un tratamiento de estabilización térmica, específico para los diferentes subproductos vitivinícolas, permite reducir la actividad del agua, y así evitar tanto el crecimiento de microorganismos como las reacciones de degradación de los compuestos fitoquímicos de interés, dando lugar a ingredientes seguros y funcionales.

5. AGRADECIMIENTOS

Ministerio de Ciencia e Innovación de España, proyecto CDTI (IDI-20200720)- Diseño y aplicación de un método de procesado a partir de residuo de vinificación generando un intermedio con propiedades funcionales para el sector nutracéutico y cosmético.

6. REFERENCIAS

1. Troilo M, Difonzo G, Paradiso VM, Summo C, Caponio F. Bioactive Compounds from Vine Shoots, Grape Stalks, and Wine Lees: Their Potential Use in Agro-Food Chains. *Foods*. 2021, 10(2): 342-358. <https://doi.org/10.3390/foods10020342>
2. Gómez-Brandón M, Lores M, Insam H, Domínguez J. Strategies for recycling and valorization of grape marc. *Crit Rev Biotechnol*. 2019, 39(4): 437-450. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1555514>.
3. Costa-Pérez A, Medina S, Sánchez-Bravo P, Domínguez-Perles R, García-Viguera C. The (Poly)phenolic Profile of Separate Winery By-Products Reveals Potential Antioxidant Synergies. *Molecules*. 2023, 28(5): 2081-2108. <https://doi.org/10.3390/molecules28052081>
4. Barros A, Gironés-Vilaplana A, Teixeira A, Collado-González J, Moreno DA, Gil-Izquierdo A, et al. Evaluation of grape (*Vitis vinifera* L.) stems from Portuguese varieties as a resource of (poly)phenolic compounds: A comparative study. *Food Res Int*. 2014, 65: 375-384. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.021>
5. Moldovan ML, Carpa R, Fizeşan I, Vlase L, Bogdan C, Iurian SM, et al. Phytochemical profile and biological activities of tendrils and leaves extracts from a variety of *vitis vinifera* l. *Antioxidants*. 2020, 9(5): 373-393. <https://doi.org/10.3390/antiox9050373>
6. Le Bourvellec C, Watrelot AA, Ginies C, Imberty A, Renard CMGC. Impact of Processing on the Noncovalent Interactions between Procyanidin and Apple Cell Wall. *J Agric Food Chem*. 2012, 60(37): 9484-9494. <https://dx.doi.org/10.1021/jf3015975>

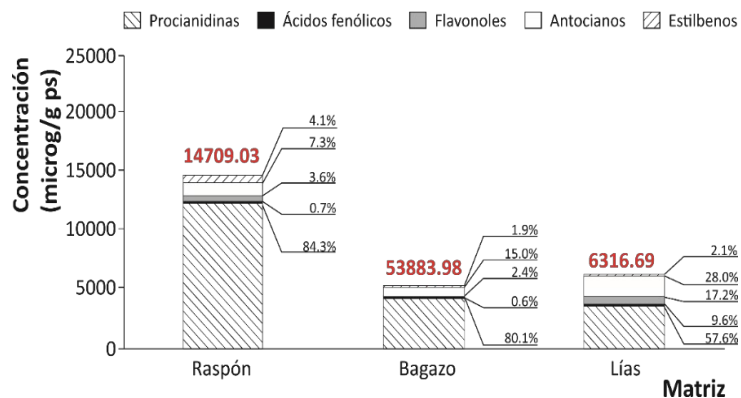


Figura 1. Composición cuantitativa de compuestos fenólicos de las matrices vínicas a tiempo 0.

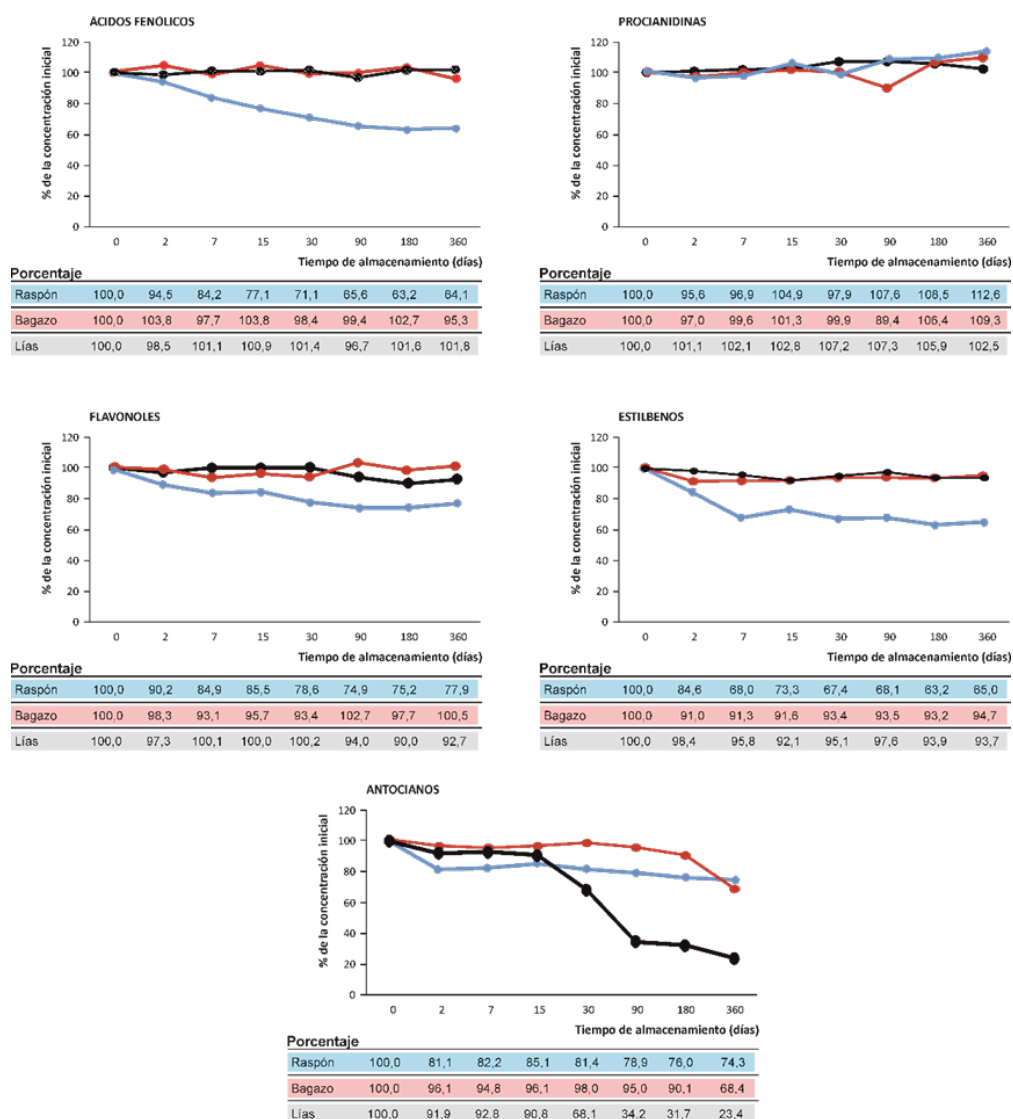


Figura 2. Estabilidad de los compuestos fenólicos presentes en los subproductos estabilizados durante 360 días de almacenamiento a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Determinaciones realizadas por triplicado matriz y tiempo ($n=6$).

Sostenibilidad medioambiental y económica de hortalizas mínimamente procesadas en fresco

Environmental and economic sustainability of fresh-cut vegetables

L. Rasines^{1*}, G. San Miguel², E. Aguayo ¹

¹Departamento de Ingeniería Agronómica, Grupo de Postrecolección y Refrigeración. Universidad Politécnica de Cartagena. P^o Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

²Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales, Grupo de Agroenergética, Universidad Politécnica de Madrid, 28006, Madrid, España.

*laura.rasines@upct.es

Resumen

Este estudio aborda la sostenibilidad ambiental y económica de las hortalizas mínimamente procesadas en fresco, desde la producción en campo hasta el mercado, mediante el análisis de ciclo de vida (ACV) y análisis de coste del ciclo de vida (ACCV). Se utilizó el método EF 3.0 para evaluar cinco categorías de impacto ambientales y se calculó el valor de puntuación única. La huella de carbono obtenida fue de 0,72 kg CO₂ eq/kg, siendo la producción de las hortalizas la etapa que más contribuyó al impacto ambiental, seguido del consumo eléctrico en la industria y por último, el transporte al mercado. Del ACCV se obtuvo un coste total de 2,62 €/kg, destacando los costes laborales como uno de los factores con mayor contribución. El índice de eco-eficiencia, definido como el comportamiento ambiental de un producto por unidad de costo monetario, mostró la producción en campo como la etapa con menor eficiencia.

Palabras clave: Análisis de Ciclo de Vida; análisis de Costes de Ciclo de Vida; eco-eficiencia; huella de carbono; de la cuna al mercado; listo para consumo.

Abstract

This research evaluated the environmental and economic sustainability of fresh-cut vegetables, which are highly demanded by consumers. An environmental life cycle assessment (E-LCA) of 1 kg of fresh-cut vegetables (cradle-to-market) has been done, using EF 3.0 method to quantify five midpoint impact categories and the single score. Furthermore, an environmental life cycle costing (E-LCC) was conducted. The carbon footprint and the total cost was 0.72 kg CO₂ eq/kg and 2.62 €/kg, respectively. The farming stage (upstream) was the greatest contributor because of vegetable production, followed by the electricity consumption for vegetable processing in the industry (core) and the transport of packaged products to market (downstream). E-LCC analysis highlighted the labour cost (core), not included in E-LCA, as the main contributor. Finally, the eco-efficiency showed that the upstream stage was the less efficient stage.

Keywords: Life Cycle Assessment; environmental life cycle costing; eco-efficiency; cradle-to-market; carbon footprint; ready to eat.

1. INTRODUCCIÓN

Las industrias agroalimentarias han incrementado su variedad de productos comercializados, introduciendo una amplia gama de alimentos listos para el consumo como las hortalizas procesadas en fresco o productos de IV gama. En España, el consumo de estos productos

ascendió a 307.780 kg en 2020, lo que supuso un incremento del 37,2% respecto al año 2018 (1). No obstante, este tipo de hortalizas cortadas puede incrementar el impacto ambiental al conllevar un mayor procesado. El análisis del ciclo de vida (ACV) es una herramienta de referencia que permite determinar el impacto ambiental. Diferentes autores han estudiado la huella ambiental de este tipo de ensaladas cortadas, identificando las aguas residuales generadas en el procesado y la producción agrícola como los puntos críticos ambientales (2,3). No obstante, la sostenibilidad de un producto no sólo está relacionada con su comportamiento medioambiental, sino también con los impactos económicos y sociales que puede generar. El análisis del coste ambiental del ciclo de vida (ACCV) es una metodología complementaria al ACV ambiental que se utiliza para analizar la sostenibilidad económica de los productos con una perspectiva de ciclo de vida. La mayoría de los estudios que utilizan el ACCV y el ACV ambiental proporcionan resultados de cada una de estas metodologías por separado, sin hacer un esfuerzo por analizarlos en su conjunto. Por esta razón, el presente trabajo tiene como objetivo cuantificar los impactos ambientales y económicos de la industria de hortalizas procesadas en fresco, describiendo la contribución de las diferentes etapas del ciclo de vida, analizando los costes de producción e integrando los resultados económicos y medioambientales en un índice de eco-eficiencia.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Definición del alcance e inventario de ciclo de vida

El alcance se estableció desde la etapa de producción en campo (cuna) hasta las puertas del supermercado (Fig. 1). Se han seleccionado tres etapas de ciclo de vida: 1) Aguas arriba (en inglés “upstream”), 2) Núcleo (en inglés “core”) y 3) Aguas abajo (en inglés “downstream”). El *upstream* incluye la producción agrícola de las hortalizas en el campo, la producción de los desinfectantes y los materiales de envasado, necesarios en el procesado de las hortalizas. El *core* describe la transformación de las hortalizas en productos acabados e incluye el transporte de las hortalizas desde el campo a la fábrica, así como el consumo de electricidad y agua de la industria, los tratamientos de aguas residuales y biorresiduos, la construcción de edificios y la fabricación de equipos de producción. Además, en esta etapa, se consideran los costes no relacionados con el impacto ambiental como los costes financieros, de mantenimiento, laborales e impuestos. El *downstream* incluye el transporte de los productos procesados en fresco envasados, el fin de vida de los envases y el valor residual del edificio y los equipos necesarios en el procesado de las hortalizas.

La unidad funcional (UF) seleccionada fue 1 kg de producto terminado. El inventario (ambiental y económico) se recopiló de la ejecución un proyecto de construcción ingenieril. Además se utilizaron las bases de datos Ecoinvent 3.8 (4) y Agribalyse v 3.0.1 (5). El inventario económico se realizó para un ciclo de 15 años (2021 – 2036), aplicándose una tasa de descuento (5%). Para la modelización del ACV ambiental se utilizó el software SimaPro 9.3 (6), la metodología de evaluación del impacto del ciclo de vida EF 3.0 v.1 (7) donde se analizaron 6 categorías ambientales. Se calculó el valor de puntuación única (en inglés “single score”) basada en las 16 categorías de punto medio. Con el objetivo de integrar los alcances ambientales y económicos, se calculó el índice de eco-eficiencia, descrito por el comportamiento ambiental de un producto por unidad de costo monetario. La puntuación más baja corresponderá con una etapa más eco-eficiente. El inventario de ciclo de vida para la evaluación ambiental y económica se puede consultar en Rasines et al. (8).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Huella medioambiental

Los impactos caracterizados totales por UF fueron: 0,72 kg de CO₂ eq/kg para cambio climático, 2,62E-03 kg NMVOC eq/kg para la formación de ozono fotoquímico, 5,10E-03 mol H⁺ eq/kg para acidificación, 1,60E-04 kg P eq/kg para eutrofización del agua dulce, 13,8 MJ/kg para

el uso de recursos fósiles, 125 μ Pt/kg para el índice de puntuación única. Como se observa en la Fig.2, la etapa *upstream* fue la que más contribuyó al impacto total, concretamente la producción agrícola (64,0 % a 81,0 %)(3), seguida de la etapa de *core* (9,1 % a 35,3 %) donde se destaca el consumo eléctrico necesario en la industria. Por último, en la etapa de *downstream* (0,7 % a 14,5 %), el transporte de los productos acabados hasta el supermercado fue la actividad de mayor impacto ambiental.

3.2 Análisis de costes de ciclo de vida

El coste total para las hortalizas procesadas en fresco fue de 2,62€₂₀₂₁ por UF. Para este análisis, la etapa *core* tuvo un mayor peso (49,6 %) que las restantes, básicamente porque integra los costes económicos y éstos no presentan un equivalente ambiental, como son los costes de financiación, mantenimiento de equipos y edificio, impuestos y empleo, este último fue el obtuvo un mayor peso. En segundo lugar, se identificó la etapa de *upstream* (38,3 %), con el coste de adquisición de las hortalizas frescas como el más relevante. Por último, la etapa de *downstream* tuvo un peso del 12,2 %, siendo el transporte del producto terminado hasta el supermercado, el más importante. García-Herrero et al. (9,10) evaluaron los costes económicos generados en la elaboración de menús en cantinas escolares, obteniendo como costes principales: el empleo y otros costes (generales, de operación, amortización y mantenimiento), todos ellos contribuyeron en un 57% al coste global, seguidos de la adquisición de los ingredientes (34 %).

3.3 Eco-eficiencia

La etapa que presentó mayores emisiones de CO₂ eq por euro gastado, y por tanto, la menos ecoeficiente fue *upstream* (0,41 kg CO₂ eq/€) y la más eco-eficiente fue el *core* (0,11 kg CO₂ eq/€).

4. CONCLUSIONES

Este estudio evaluó la sostenibilidad ambiental y económica de las hortalizas procesadas en fresco, desde la producción en campo hasta el supermercado, obteniendo una HC total de 0,72 kg CO₂ eq/kg. La etapa de *upstream*, principalmente la producción agrícola, constituyó el punto crítico en la evaluación ambiental. No obstante, ésta fue la segunda causa en la evaluación económica y además resultó ser la etapa menos eco-eficiente. Por esta razón, para mejorar la sostenibilidad de las hortalizas procesadas en fresco se sugiere focalizarse en esta fase.

5. AGRADECIMIENTOS

Ministerio de Ciencia e Innovación - Agencia Estatal de Investigación (MCIN/AEI/10.13039/501100011033) y de "FEDER A way of making Europe" (Unión Europea) [RTI2018-099139-B-C21]. Laura Rasines agradece el apoyo financiero para su contrato predoctoral del MCIN/AEI [PRE 2019-090573].

6. REFERENCIAS

1. MAPA. Informe del consumo alimentario en España [Internet]. 2018 [cited 2022 Dec 29]. p. 1-538. Available from: https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/20190807_informedeconsumo2018pdf_tcm30-512256.pdf
2. Fusi A, Castellani V, Bacenetti J, Cocetta G, Fiala M, Guidetti R. The environmental impact of the production of fresh cut salad: a case study in Italy. *Int J Life Cycle Assess.* 2016;21(2):162-75.
3. Vigil M, Pedrosa-Laza M, Cabal JVA, Ortega-Fernández F. Sustainability analysis of active packaging for the fresh cut vegetable industry by means of attributional & consequential life cycle assessment. *Sustainability.* 2020;12(17):7207.
4. Ecoinvent. Ecoinvent Database 3.8 [Internet]. 2021 [cited 2023 Dec 1]. Available from: <https://ecoinvent.org/the-ecoinvent-database/data-releases/ecoinvent-3-8/#1610466712069-fcebe4bb-f802>
5. Asselin-Balençon A, Broekema R, Teulon H, Gastaldi G, Houssier J, Moutia A, et al. Agribalyse V 3.0: the French agricultural and food LCI database. Methodology for the food products. [Internet]. ADEME. 2020 [cited 2022 May 27]. p. 85. Available from: <https://doc.agribalyse.fr/documentation-en/agribalyse-data/documentation>

6. PRÉ Consultant. SimaPro [Internet]. The Netherlands; 2022 [cited 2021 Oct 2]. Available from: <https://simapro.com/>
7. Fazio S, Biganzioli F, De Laurentiis V, Zampori L, Sala S, Diaconu E. Supporting information to the characterisation factors of recommended EF Life Cycle Impact Assessment methods, version 2, from ILCD to EF 3.0, EUR 29600 EN, European Commission, Ispra, 2018, ISBN 978-92-79-98584-3, doi:10.2760/002447, PUBSY No. JRC114822. New Models and Differences with ILCD, EUR. 2018. 49 p.
8. Rasines L, Morera S, San Miguel G, Artés-Hernández F, Aguayo E. Environmental and economic sustainability of fresh-cut and pre-cooked vegetables. Sci Total Environ [Internet]. 2023 May;872(November 2022):162169. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162169>
9. García-Herrero L, De Menna F, Vittuari M. Food waste at school. The environmental and cost impact of a canteen meal. Waste Manag. 2019;100:249–58.
10. García-herrero L, Costello C, Menna F De, Schreiber L, Vittuari M. Eating away at sustainability . Food consumption and waste patterns in a US school canteen. J Clean Prod [Internet]. 2021;279:123571. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123571>

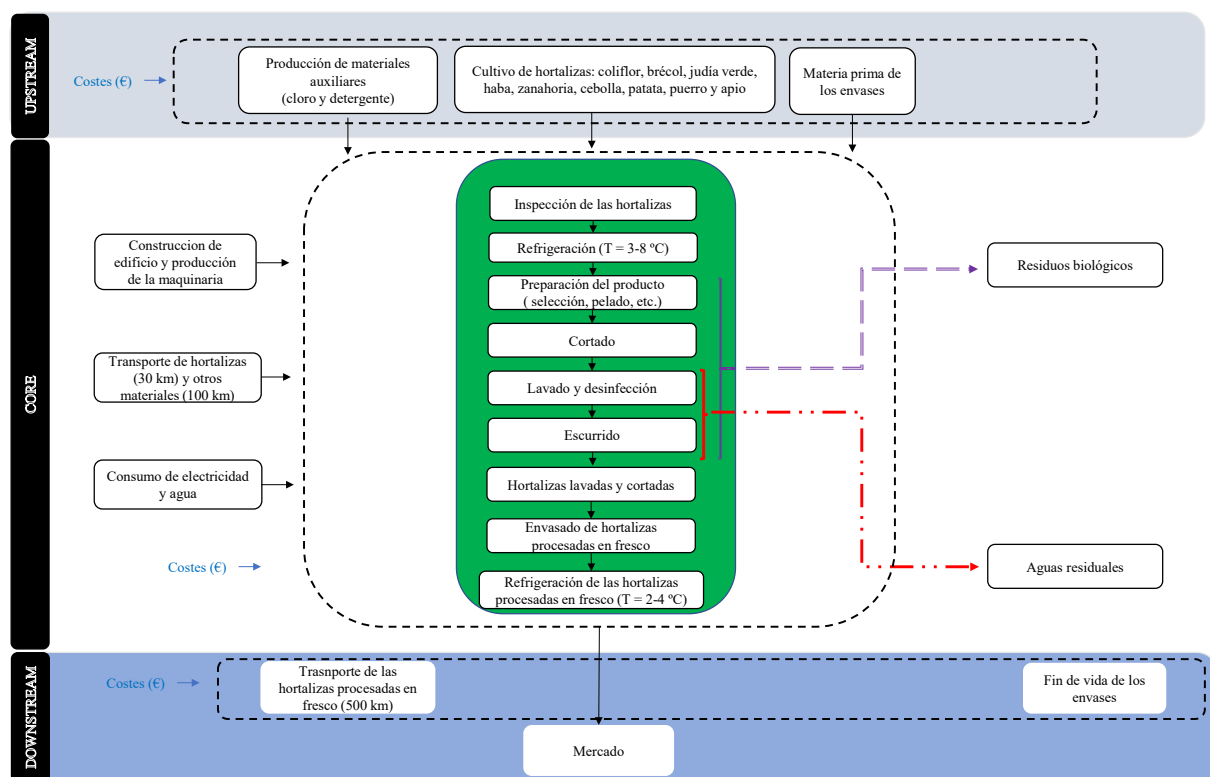


Figura 1. Diagrama de ciclo de vida de las hortalizas procesadas en fresco.

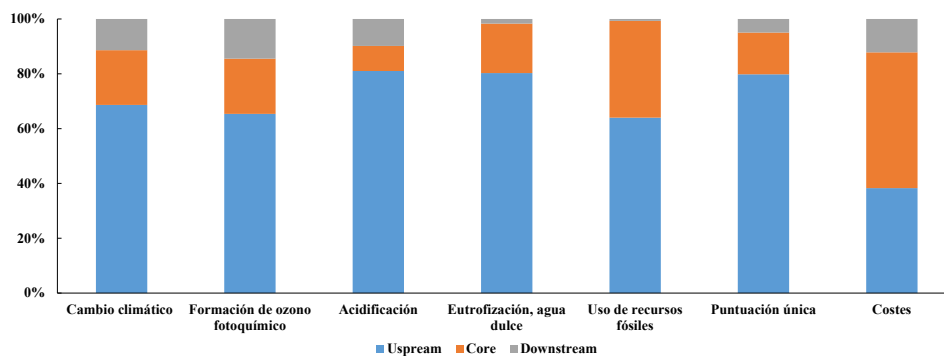


Figura 2. Contribución de los impactos caracterizados de las hortalizas procesadas en fresco.

Revalorización del tallo de brócoli mediante la elaboración de un fermentado (encurtido)

Revalorization of broccoli stalks through the production of a fermented (pickled) product

J. A. Salas-Millán^{1,2*}, A. Conesa-Bueno², E. Aguayo¹

¹Grupo de Postrecolección y Refrigeración. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203, Cartagena, Murcia, España.

²JimboFresh International SLL, C/Mina Buena Suerte, 1, 30360 La Unión, Murcia, España.

*joseangel.salas@upct.es

Resumen

El objetivo de esta investigación consistió en desarrollar un alimento fermentado obtenido bajo un modelo de economía circular, a partir de los subproductos del brócoli (tallo), utilizando su propio fitomicrobioma. Los tallos se cortaron en rodajas, y se fermentaron en una solución de salmuera, evaluándose dos tipos de aderezos (ajo y semillas de mostaza) frente a un testigo sin aderezar. El proceso de fermentación se realizó durante 6 días a 25 °C, seguido de 6 días a 4 °C. Se caracterizaron los glucosinolatos (GSL) individuales mediante cromatografía de masas de triple cuadrupolo (LC-ESI-QqQ-MS/MS). Se observó un incremento en el contenido total de GSL en el tallo de brócoli pasado tres días de fermentación, que disminuyó y se mantuvo estable tras la fermentación y almacenamiento en frío. En cambio, se observó una transferencia de GSL totales desde la matriz al líquido de gobierno en los encurtidos testigo y aderezo de ajo.

Palabras clave: Fermentación; subproductos; metagenómica; probiótico.

Abstract

The aim of this research was to develop a fermented food obtained under a circular economy model, from broccoli by-products (stems), using its own phytomicrobiome. The stems were sliced and fermented in a brine solution, evaluating two types of seasonings (garlic and mustard seeds) against an unseasoned control. The fermentation process was carried out for 6 days at 25 °C, followed by 6 days at 4 °C. Individual glucosinolates were characterised by triple quadrupole mass chromatography (LC-ESI-QqQ-MS/MS). An increase in total glucosinolate content was observed in the broccoli stem after three days of fermentation, which decreased and remained stable after fermentation and cold storage. In contrast, a transfer of total glucosinolates from the matrix to the governing liquid was observed in the control pickles and garlic dressing.

Keywords: Fermentation; by-products; metagenomics; LC-MS; probiotic.

1. INTRODUCCIÓN

La popularidad de los alimentos vegetales fermentados está aumentando y se espera que continúe en la próxima década, con un valor actual de más de 500 millones de dólares en el mercado estadounidense y aún mayor a nivel mundial (1). Los alimentos fermentados se han utilizado desde el año 13.000 a.C. por su capacidad para prolongar la vida útil durante el almacenamiento de los alimentos. Además, estudios recientes han destacado sus beneficios nutricionales para la salud debido a la presencia de microorganismos potencialmente probióticos

(2). La industria hortofrutícola genera grandes cantidades de subproductos, ricos en compuestos bioactivos, beneficiosos para la salud que pueden reducir la progresión de enfermedades crónicas como la diabetes y la obesidad, enfermedades cardiovasculares e intestinales (3). El brócoli, reconocido por sus compuestos funcionales como fenoles, vitamina C y glucosinolatos (4), genera grandes cantidades de subproductos (raíces, tallo y hojas), ya que sólo se aprovecha la inflorescencia, la cual representa el 15% de la biomasa total (5). Por este motivo, esta investigación tiene como objetivo la revalorización del tallo de brócoli mediante el diseño de un nuevo producto alimentario fermentado con potencial probiótico y funcional.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Desarrollo de producto

Los tallos de brócoli (*Brassica oleracea L. var Italica, cv. Parthenon*) se obtuvieron de la Cooperativa Levante Sur (La Palma, Cartagena, España). Los tallos se cortaron en láminas de 6 mm utilizando una cortadora automática (Eurocort F250E, España) y se envasaron en tarros de vidrio con salmuera (sal común, 6% p/v). Para mantener las condiciones anaeróbicas durante el proceso de fermentación, se utilizó un *airlock* en la parte superior de las tapas. Se probaron dos aderezos: dientes de ajo fresco (8 g/envase) y granos de mostaza secos (10 g/envase) frente a un testigo sin aderezar. La fermentación espontánea tuvo lugar en condiciones de oscuridad a 25 °C durante 6 días, seguidas de un almacenamiento en refrigeración a 4 °C durante 6 días. Se realizaron análisis periódicos, utilizando tres repeticiones por tratamiento.

2.2 Caracterización y cuantificación de GSL

Se utilizaron 2 g de muestra congelada y se extrajo con una dilución de metanol al 70% e incubación a 70 °C para la inactivación de la enzima mirosinasa. Seguidamente, se centrifugó el extracto y se filtró. El líquido de gobierno se centrifugó y filtró directamente para el análisis de GSL. Se identificaron los glucosinolatos mediante LC-MS/MS-QqQ. El tiempo de retención y los espectros de fragmentación MS y MS/MS se compararon con un estándar comercial o se identificaron tentativamente comparando su patrón de fragmentación con los datos bibliográficos disponibles y en las bases de datos MassBank Europe, MassBank of North America y PubChem. Para la cuantificación, se usaron glucorafanina y glucobrasicina como estándares externos de GSL alifáticos e indólicos, respectivamente. Los resultados se expresaron en mg de GSL por kilogramo peso fresco (p.f.) o litro de líquido de gobierno.

2.3. Análisis estadístico

Para conocer cómo influía el tipo de aderezo en los GSL se realizó, para cada uno de los tiempos de conservación (fermentación y almacenamiento en frío), un análisis de varianza (ANOVA, $p \leq 0,05$) y cuando los tratamientos presentaron diferencias significativas, éstas fueron comparadas con la prueba LSD (Statgraphic Plus versión 5.1, 2001).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se identificaron nueve GSL en los tallos crudos (6), cinco de los cuales pertenecían a GSL alifáticos (glucoiberina, glucorafanina, glucoiberiverina, glucoerucina, gluconasturtina) y cuatro a GSL indólicos (4-hidroxyglucobrasicina, glucobrasicina, 4-metoxiglucobrasicina y neoglucobrasicina) (Figura 1). El contenido en GSL totales fue de 79,3 mg/kg de p.f., distribuyéndose en un 37 y 63% como alifáticos e indólicos, respectivamente. Durante el proceso de fermentación, los GSL alifáticos aumentaron en el tronco de brócoli al tercer día, en todos los tratamientos (Figura 1A), disminuyendo en un 90 % al finalizar la fermentación (día 6), manteniéndose en un rango en torno 4,05 a 7,64 mg/kg de p.f. en los encurtidos de testigo y aderezo de ajo, y 0,06 a 0,13 mg/kg pf en el encurtido con aderezo de mostaza. Glucoerucina fue el GSL alifático con mayor concentración en el tallo de brócoli a lo largo del proceso de fermentación y almacenamiento en refrigeración, seguido de glucorafanina y gluconasturtina. Los

GSL indólicos (Figura 1B) aumentaron más levemente tras tres días de fermentación (3 a 17%) y, finalizado el proceso de fermentación (día 6), disminuyeron (90 a 95%) al igual que los GSL alifáticos. Esta disminución en GSL totales es debido a la rotura del tejido vegetal tras el corte en rodajas y actividad enzimática microbiana, lo que liberaría la enzima mirosinasa que hidrolizaría los glucosinolatos en subproductos de degradación (7). La tendencia en el contenido de GSL individuales en el líquido de gobierno (Figura 1C y D) fue diferente al que se observó en el tronco de brócoli (Figura C y D). Se asumió que en el día 0, no hubo transferencia de glucosinolatos de la matriz al líquido de gobierno, y se realizó el análisis de los días 3, 6, 9 y 12. En el tercer día de fermentación se cuantificaron, sin observar diferencias estadísticamente significativas, 1,25 a 1,79 mg/L de GSL totales en el líquido de gobierno, de los cuales las proporciones eran 1:10 en GSL alifáticos e indólicos, predominando 4-metoxiglucobrasicina (0,12 – 0,32 mg/L), posiblemente por su carácter más apolar, facilitó su transferencia por difusión pasiva a través de la pared vegetal. Finalizada la fermentación (día 6), se observó un incremento en la cuantificación de GSL totales en testigo y aderezo de ajo, y se mantuvo estable durante el almacenamiento en frío sin diferencias estadísticamente significativas (22,2 a 25,6 mg/L). Este aumento correspondió con un incremento en la transferencia desde la matriz (tronco de brócoli) hacia el líquido de gobierno, fundamentalmente con un aumento de la glucoerucina (9,0 a 10,6 mg/L) y de GSL indólicos como 4-metoxiglucobrasicina (5,5 a 6,6 mg/L) y neoglucobrasicina (3,2 a 4,5 mg/L). En cambio, no se observaron cambios significativos de GSL alifáticos en el encurtido con aderezo de mostaza durante la fermentación y almacenamiento en frío (0,09 a 0,15 mg/L). Por otro lado, si se observó un incremento en GSL indólicos, principalmente en 4-metoxiglucobrasicina, tras la fermentación (1,3 y 3,6 mg/L, en los días 3 y 6, respectivamente) y durante el almacenamiento en frío (5,7 mg/L en el día 9), disminuyendo en el día 12 (3,3 mg/L). Esta disminución en el contenido de GSL totales en el líquido de gobierno del aderezo de mostaza pudo ser debida a la actividad de la enzima mirosinasa presente en las semillas de mostaza, que fue liberada tras su molturación, provocando la hidrólisis de los GSL en otros productos de degradación.

4. CONCLUSIONES

Los tallos de brócoli fermentados de forma espontánea proporcionaron un alimento vegano, probiótico y funcional, rico bacterias ácido lácticas y GSL. Al tercer día de fermentación, los tallos de brócoli presentaron el mayor contenido en GSL totales, disminuyendo una vez finalizada la fermentación y manteniéndose estable a lo largo de su almacenamiento en frío. Sin embargo, la concentración en GSL totales en el líquido de gobierno se incrementó tras la fermentación en los encurtidos testigo y con aderezo de ajo, excepto el encurtido con aderezo de semillas de mostaza, debido a la hidrólisis de los GSL por la enzima mirosinasa. La revalorización de los subproductos promueve la economía circular y mejora la eficiencia y la rentabilidad en el sector alimentario.

5. AGRADECIMIENTOS

Ministerio de Ciencia e Innovación (MICIN), Agencia Estatal de Investigación (MCIN/AEI/10.13039/501100011033) y de "FEDER A way of making Europe" (UE) [RTI2018-099139-B-C21]. José-Angel Salas-Millán agradece el apoyo financiero para el desarrollo del "Doctorado Industrial" (DIN2019-010837) del MICIN y de JimboFresh International SLL.

6. REFERENCIAS

1. Schilling W, Campbell Y. Fermented Foods Processing: Flavor, Preservation, and Health. Food Technology Magazine [Internet]. 2021 [cited 2022 Feb 14];75(7):3. Available from: <https://www.ift.org/news-and-publications/food-technology-magazine/issues/2021/august/columns/processing-fermented-foods>
2. Lahtinen S, Ouwehand AC, Salminen S, von Wright A. Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects, fourth edition [Internet]. 4th ed. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Fourth Edition. 2011 [cited 2022 Jan 22]. 1–761 p. Available from: https://www.researchgate.net/publication/330485129_Lactic_acid_bacteria_Microbiological_and_functional_aspects_fourth_edition

- Gil-Martín E, Forbes-Hernández T, Romero A, Cianciosi D, Giampieri F, Battino M. Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products. *Food Chem.* 2022 Jun 1;378:131918.
- Vallejo F, Tomás-Barberán FA, García-Vigueras C. Potential bioactive compounds in health promotion from broccoli cultivars grown in Spain. *J Sci Food Agric* [Internet]. 2002 Sep 1 [cited 2022 Feb 15];82(11):1293-7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jsfa.1183>
- Liu M, Zhang L, Ser SL, Cumming JR, Ku KM. Comparative phytonutrient analysis of broccoli by-products: The potentials for broccoli by-product utilization. *Molecules* [Internet]. 2018 Apr 13 [cited 2022 Feb 15];23(4):900. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/4/900/htm>
- Salas-Millán JÁ, Aznar A, Conesa E, Conesa-Bueno A, Aguayo E. Functional food obtained from fermentation of broccoli by-products (stalk): Metagenomics profile and glucosinolate and phenolic compounds characterization by LC-ESI-QqQ-MS/MS. *LWT.* 2022 Nov 1;169:113915.
- Sarvan I, Valerio F, Lonigro SL, de Candia S, Verkerk R, Dekker M, et al. Glucosinolate content of blanched cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata) fermented by the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* LMG-P22043. *Food Research International* [Internet]. 2013;54(1):706-10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.065>

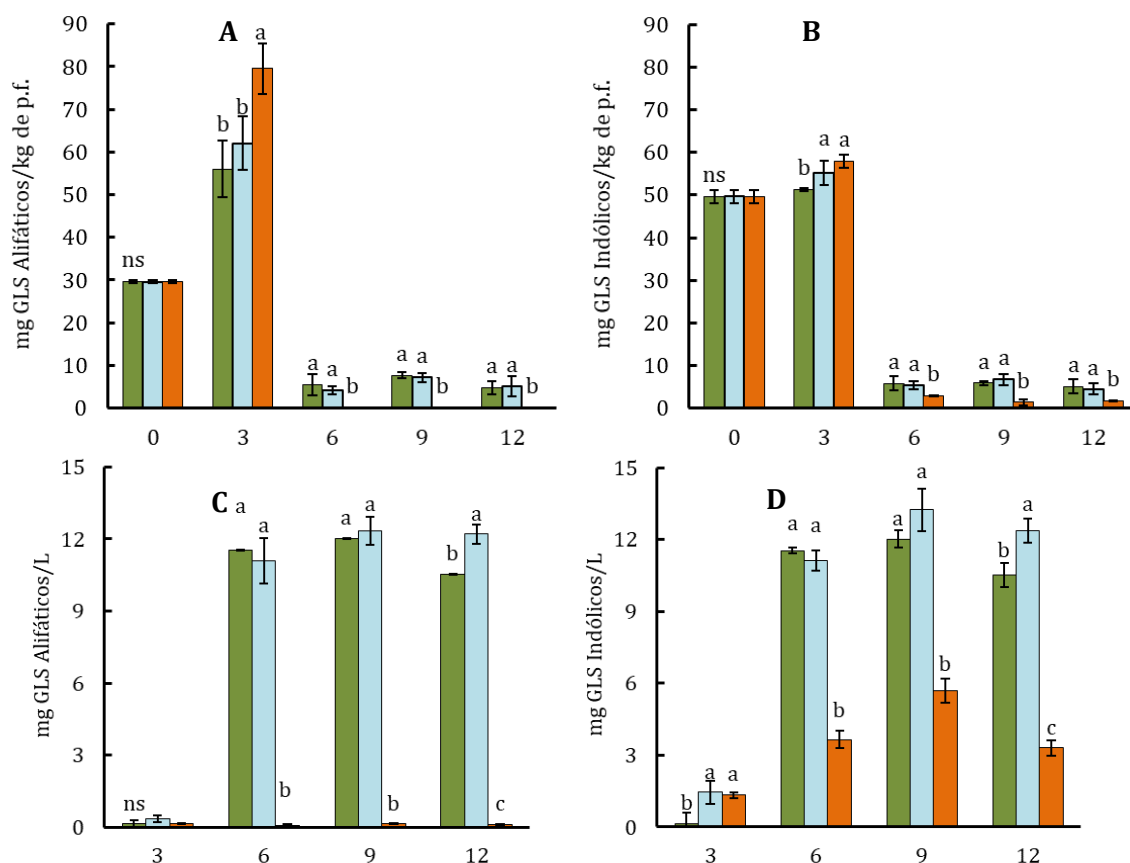


Figura 1. Cuantificación de GSL alifáticos e indólicos en tallo de brócoli (A y B) y líquido de gobierno (C y D) de los encurtidos testigo (■), aderezo de ajo (■) y aderezo de semillas de mostaza (■), durante la fermentación (días 3 y 6) y almacenamiento a 5 °C (días 9 y 12). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para cada periodo de conservación.

Determinación de la calidad funcional en nuevos híbridos de uva de mesa con pulpa tintorera

Functional quality of new table grape hybrids with red berry flesh

P. Crespo^{1*}, M.I. Serrano², L. Martínez-Zamora^{3,4}, F. Artés-Hernández⁴, M. Tornel¹

¹Equipo de Mejora de Uva de Mesa, Departamento Biotecnología, Genómica y Mejora Genética, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental. C/ Mayor, s/n, 30150, La Alberca, Murcia, España.

²Investigación y Tecnología de Uva de Mesa. Paraje Lomas de Marín, s/n, 30540, Blanca, Murcia, España.

³Grupo de Postrecolección y Refrigeración, Departamento de Ingeniería Agronómica e Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena. P^o Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

⁴Departamento de Nutrición y Bromatología. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo, 30100, Murcia, España.

*pablo.agro.cresp@gmail.com

Resumen

Las variedades de uva de mesa con pulpa tinta han tomado gran interés para los programas de mejora vegetal siguiendo una línea saludable. El principal objetivo de este trabajo es comparar variedades comerciales frente a híbridos de interés con pulpa tinta ricos en antioxidantes y compuestos bioactivos. Las variedades comerciales Itumfive, Itumnine, e Itumtwelve fueron comparadas con nuevos híbridos de pulpa tinta Hsd (Alicante Bouschet x Itumone) y Hsl (15-284-535 x Itumfifteen) en cuanto a los Compuestos Fenólicos Totales (CFT) y la Capacidad Antioxidante Total (CAT) mediante determinaciones espectrofotométricas. Los nuevos híbridos han registrado valores en pulpa entre 1,9 y 5,1 veces mayores en CFT frente a variedades comerciales. La CAT en las bayas ha representado entre 1,2 y 6,9 veces mayor contenido en los nuevos híbridos frente a las variedades comerciales. En conclusión, las variedades con pulpa tinta están genéticamente enriquecidas en compuestos saludables.

Palabras clave: *Vitis vinifera* L.; uvas tintoreras; fitoquímicos; antocianos; nutraceuticos.

Abstract

Red berry flesh table grape cultivars have recently become very important in breeding programs as a healthy challenge. The main objective of this work is to compare commercial varieties with potential new varieties with red berry flesh rich in antioxidants and bioactive compounds. Commercial varieties Itumfive, Itumnine, and Itumtwelve were compared with new hybrids with red berry flesh Hsd (Alicante Bouschet x Itumone) and Hsl (15-284-535 x Itumfifteen) in terms of their Total Phenolic Compounds (TPC) and Total Antioxidant Capacity (TAC) by using spectrophotometric determinations. New hybrids showed from 1.9 up to 5.1-fold higher TPC in berry pulp regarding commercial varieties. TAC in the whole berry reported from 1.2 up to 6.9 - fold higher content between new hybrids from commercial varieties. As conclusion, red berry flesh cultivars are genetically enriched in healthy promoting compounds.

Keywords: *Vitis vinifera* L.; teinturier grapes; phytochemicals; anthocyanin; nutraceuticals.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de uva de mesa en el mundo se ha duplicado en los últimos veinte años (1). En este panorama, las variedades tradicionales con semilla están dejando paso a nuevas variedades sin semilla dentro de una agricultura rentable y sostenible centrada en la demanda de los consumidores. En este sentido, los diferentes objetivos en los programas de mejora vegetal para la obtención de nuevas variedades de uva de mesa sin semilla están centrados en ofrecer variedades alargando el calendario productivo, ofreciendo nuevos sabores, formas y variedades resistentes a enfermedades (2). Es conocida el beneficio saludable asociado al consumo del vino debido a sus compuestos antioxidantes y compuestos fenólicos (3). Por ello, y por su carácter diferenciador, recientemente se ha introducido la característica de las uvas de mesa con pulpa tinta en los programas de mejora vegetal de uva de mesa, siendo el objetivo principal del presente trabajo la determinación de estos compuestos bioactivos de interés en la tesis doctoral que se está desarrollando.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

El material vegetal muestreado objeto de este estudio fueron 3 variedades de uva de mesa cultivadas en la Región de Murcia: Itumfive (It-5), Itumnine (It-9) e Itumtwelve (It-12); así como 2 híbridos seleccionados de interés con pulpa coloreada y con códigos Hsd y Hsl, fruto de los cruzamientos por mejora vegetal de Alicante Bouschet x Itumone y 15-284-535 x Itumfifteen, respectivamente. Los muestreos tuvieron lugar en la 'Finca Cuatro Viento', una finca experimental de Investigación y Tecnología de Uva de Mesa (ITUM) en Blanca (Murcia, España). Fueron realizados en dos momentos: en primer lugar, muestras del híbrido Hsl el 8 de agosto de 2022, bajo condiciones de recolección de 21ºBrix y 5,3 mgL⁻¹ de acidez. Posteriormente tuvo lugar el resto de muestreos el 21 de septiembre de 2022 bajo condiciones de recolección comprendidas para las diferentes muestras entre 17,6 – 20,2ºBrix y 2,7 – 3,5 mgL⁻¹ de acidez. Todas las muestras fueron conservadas a -80°C tras su recolección hasta la preparación y determinación de compuestos bioactivos de manera conjunta en octubre de 2022.

2.2 Preparación de muestras

Se tomaron un total de 15 – 20 bayas por muestra. Las muestras se pelaron, obteniendo por separado la piel y pulpa de las mismas, descartando las semillas en su caso, todo ello bajo condiciones de frío y de semi-oscuridad, se liofilizaron (Alpha 1-4 LSC, Martin Christ, Alemania) y se obtuvo el extracto (4) para proceder a las determinaciones espectrofotométricas.

2.3 Determinación de Compuestos Fenólicos Totales

Los CFT fueron determinados como previamente descrito por Singleton y Rossi (5), con medida espectrofotométrica a 765 nm.. La expresión de los CFT se ha efectuado como g de ácido gálico equivalente (GAE) kg⁻¹ de peso seco (ps).

2.4 Determinación de Capacidad Antioxidante Total

La CAT se llevó a cabo por el método DPPH según Castillejo et al., (6), con medida espectrofotométrica a 515 nm. La expresión de la CAT se ha efectuado como g de trólox equivalente (TE) kg⁻¹ de peso seco (ps).

2.5 Análisis estadístico

Se ha efectuado un análisis de varianza (ANOVA) con el programa SPSS 25 (IBM, Armonk, Nueva York, EE.UU.) donde cada una de las muestras han sido el factor, y las variables han sido cada una de las determinaciones de compuestos bioactivos efectuadas, así como la textura. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) se separaron en subconjuntos homogéneos por comparaciones múltiples 2 a 2 utilizando el método Tukey.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El total de compuestos bioactivos registrados como CFT en las muestras (Fig. 1), muestran los valores más elevados $7,8 \pm 0,7$ y $13,4 \pm 1,1$ g GAE kg^{-1} ps, que corresponden a los híbridos de pulpa tinta Hsd y Hsl; el resto de valores son $1,5 \pm 0,2$, $3,2 \pm 0,5$ y $5,8 \pm 0,7$ g GAE kg^{-1} ps, respectivamente para las variedades comerciales It-5, It-9 e It-12. El rango de datos obtenidos es coherente con lo mostrado en estudios de uvas de vinificación comparados con uvas de mesa en Italia, con valores entre $0,44 \pm 0,02$ y $7,94 \pm 0,19$ mg GAE/g, por Lorenzo et al., (7), así como con cinco variedades de uva de mesa estudiadas en Argelia (8), con valores de $1,21 \pm 0,04$ – $3,35 \pm 0,21$ mg GAE/g. Se destaca en este estudio que los nuevos híbridos han mostrado valores en pulpa entre 1,9 y 5,1 veces mayores en CFT frente a variedades comerciales.

Del mismo modo, la CAT determinada en las muestras (Fig. 2), diferenció 2 grandes grupos: a) las muestras con mayor cantidad de compuestos bioactivos antioxidantes, que corresponden a los híbridos de pulpa tinta, con valores de $6,7 \pm 0,8$ y $12,8 \pm 0,2$ g TE kg^{-1} ps, respectivamente para Hsd y Hsl; b) las muestras con menor cantidad de compuestos bioactivos antioxidantes, que corresponden a las variedades comerciales, con valores de $1,9 \pm 0,5$, $2,8 \pm 0,6$ y $5,5 \pm 0,9$ g TE kg^{-1} ps, respectivamente para It-5, It-9 e It-12. Los estudios citados, (7) y (8), correlacionan los resultados de CFT y CAT, como ocurre con las muestras de este trabajo. El rango de valores en CAT mostrado en otro estudio (9), para cinco variedades de uva de mesa, es entre 1,90 – 5,34 mg TE/g (32 – 90 $\mu\text{mol/g}$ ps), está en el rango del presente estudio para las variedades comerciales. En nuestro trabajo se pone de manifiesto que la CAT en las bayas ha representado entre 1,2 y 6,9 veces mayor contenido en los nuevos híbridos frente a las variedades comerciales.

4. CONCLUSIONES

Los híbridos con pulpa roja respecto a las variedades comerciales con pulpa blanca, tienen un mayor contenido en compuestos bioactivos expresados como CFT y CAT. Así, las variedades con pulpa tinta están enriquecidas genéticamente con compuestos saludables sin perjudicar otros parámetros de calidad.

5. AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia y al IMIDA la contratación de Pablo Crespo Ródenas (Cod. 583701) para el proyecto “Mejora genética de especies agrícolas de interés para la Región de Murcia” y con código “FEDER 1420-21 Uva”. Se agradece al Instituto de Biotecnología Vegetal de la UPCT el uso de determinados equipamientos. El contrato L. Martínez-Zamora ha sido financiado por el Programa de Recualificación del Sistema Universitario Español, modalidad Margarita Salas, de la Universidad de Murcia.

6. REFERENCIAS

1. OIV. 2019 Statistical Report on World Vitiviniculture. [Internet]. 2019;23. Available from: <http://www.oiv.int/public/medias/5029/world-vitiviniculture-situation-2016.pdf>
2. Crespo Ródenas P. Biblioteca Horticultura [Internet]. Nuevas variedades de uva de mesa. 2023. Available from: https://issuu.com/horticulturapocosecha/docs/nuevas_variedades_de_uva_de_mesa
3. Bonnefont-Rousselot D. Resveratrol and cardiovascular diseases. *Nutrients*. 2016;8(5):1–24.
4. Crespo P, Martínez-Zamora L, Artés-Hernández F, Tornel M. Towards grape vineyards rich in bioactive compounds. *Grapevine Physiology Biotechnol*. 2021;
5. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965;16:144–58.
6. Castillejo N, Martínez-Hernández GB, Monaco K, Gómez PA, Aguayo E, Artés F, et al. Preservation of bioactive compounds of a green vegetable smoothie using short time-high temperature mild thermal treatment. *Food Sci Technol Int*. 2017;23(1):46–60.
7. Lorenzo C Di, Colombo F, Biella S, Orgiu F, Frigerio G, Regazzoni L, et al. Phenolic profile and antioxidant activity of different grape (*Vitis vinifera* L.) varieties. 41st World Congr Vine Wine. 2019;04005:0–6.

8. Derradji-Benmeziane F, Djamai R, Cadot Y. Antioxidant capacity, total phenolic, carotenoid, and Vitamin C contents of five table grape varieties from Algeria and their correlations. *J Int des Sci la Vigne du Vin*. 2014;48(2):153-62.
9. Muzolf-Panek M, Waśkiewicz A. Relationship between Phenolic Compounds, Antioxidant Activity and Color Parameters of Red Table Grape Skins Using Linear Ordering Analysis. *Appl Sci*. 2022;12(12).

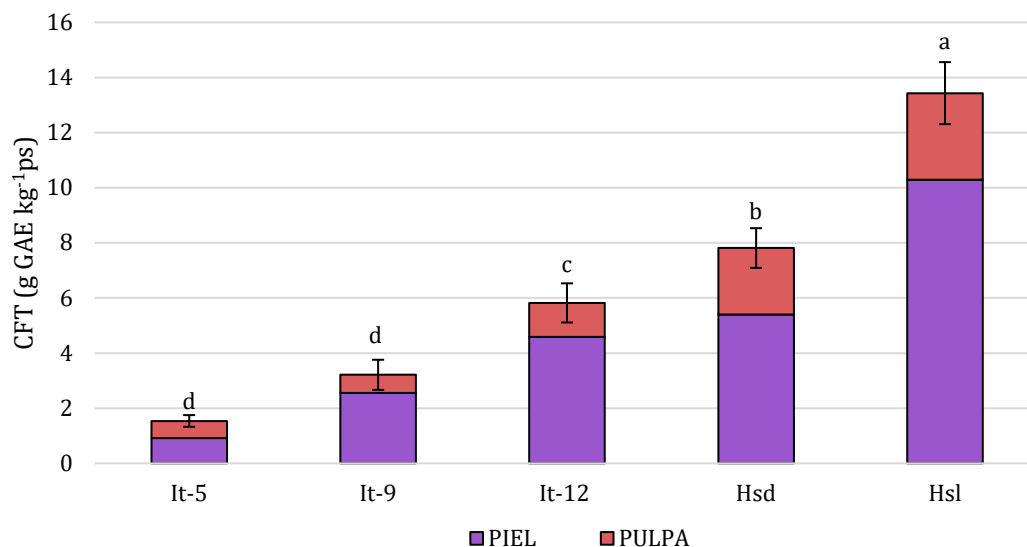


Figura 1. Compuestos Fenólicos Totales (piel + pulpa) de 3 variedades de uva de mesa comerciales: Itumfive (It-5), Itumnine (It-9) e Itumtwelve (It-12) y 2 híbridos de interés con pulpa coloreada (Hsd y Hsl). Letras distintas muestran diferencias significativas ($p < 0,05$)

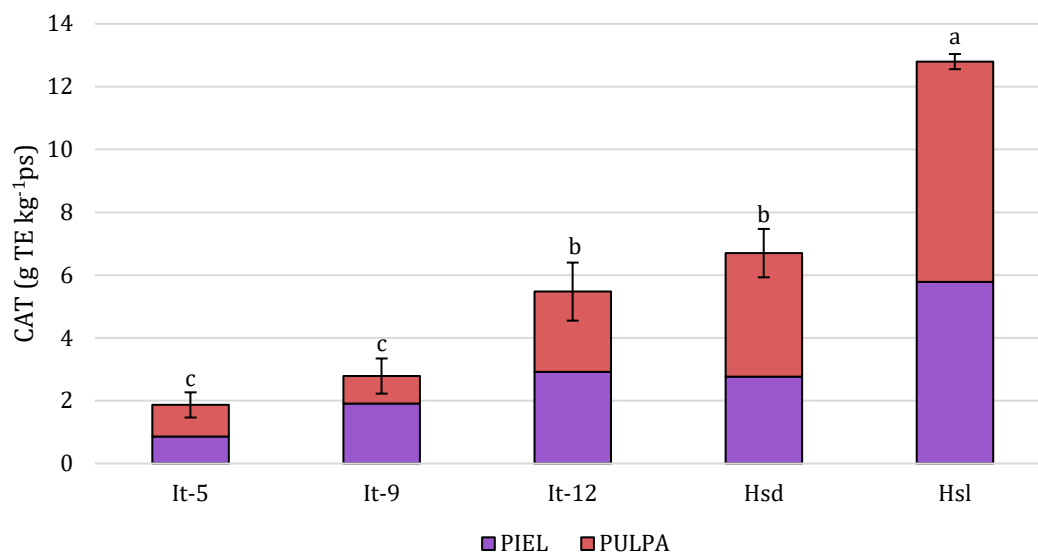


Figura 2. Capacidad Antioxidante Total (piel + pulpa) de 3 variedades de uva de mesa comerciales: Itumfive (It-5), Itumnine (It-9) e Itumtwelve (It-12) y 2 híbridos de interés con pulpa coloreada (Hsd y Hsl). Letras distintas muestran diferencias significativas ($p < 0,05$)

Efecto de la adaptación de *Listeria monocytogenes* a tratamientos térmicos subletales en su resistencia al calor

Effect of the adaptation of *Listeria monocytogenes* to sublethal heat treatments on its resistance to heat

A. Luciano^{1*}, S. Guillén^{1,2}, A. Palop¹, P.S. Fernández¹

¹Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. P^o Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

²Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2 - Universidad de Zaragoza-CITA, Zaragoza, España.

*antonio.luciano@upct.es

Resumen

Listeria monocytogenes es una de las bacterias patógenas más comunes que pueden encontrarse en los alimentos porque puede adaptarse muy bien a factores estresantes como temperaturas bajas o pH ácidos. Las verduras envasadas, la leche sin pasteurizar, el queso y los productos cárnicos son los alimentos en los que se puede encontrar. La mayoría de estos productos están expuestos a tratamientos térmicos para asegurar su conservación. En algunas circunstancias, esta bacteria puede aumentar su resistencia térmica, si se trata a temperaturas subletales. El objetivo de esta investigación fue seleccionar poblaciones de *L. monocytogenes* resistentes al calor tras aplicar tratamientos térmicos prolongados a temperaturas de tratamiento bajas (1 hora a 55°C) y tratamientos térmicos cortos a temperaturas altas (1 minuto a 65°C). Los resultados obtenidos muestran que el microorganismo es capaz de aumentar su resistencia al calor en ambas situaciones, tras ciclos sucesivos de tratamiento térmico y crecimiento.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*; inactivación térmica; pasteurización.

Abstract

Listeria monocytogenes is one of the most common foodborne pathogenic bacteria. It can adapt very well to stressors such as low temperatures or acidic pH. It is mostly found in food product like packaged vegetables, raw milk, cheese, and meat products. Most of these food products undergo a heat treatment to ensure preservation. In some circumstances, this bacterium can increase its heat resistance, if treated at sub-lethal temperatures. The aim of this study was to select heat-resistant populations of *L. monocytogenes* after prolonged heat treatments: long heat treatment at a lower temperature (1 hour at 55°C) and short heat treatments at a higher temperature (1 minute at 65°C). The obtained results show that the *L. monocytogenes* is able to increase its heat resistance in both situations, after successive cycles of heat treatment and growth.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; thermal inactivation; pasteurization.

1. INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes es una de las bacterias patógenas más relevantes en el mundo alimentario. Si bien causa relativamente pocos casos de enfermedades de transmisión alimentaria, es una de las bacterias que más letalidad causa (1). Esta bacteria es capaz de desarrollar resistencia a las condiciones adversas de los medios alimenticios. De hecho, se puede encontrar en muchos alimentos que no hayan sido sometidos a tratamientos térmicos previos,

como por ejemplo leche cruda, vegetales confeccionados, leche no pasteurizada, quesos y productos cárnicos. La resistencia al calor de los microorganismos en los alimentos se ve afectada tanto por la composición del alimento como por la condición fisiológica de las células o esporos microbianas. Las características de los alimentos que conducen a una mayor resistencia al calor de un organismo incluyen la actividad del agua y la presencia de carbohidratos, lípidos, proteínas, sal, etc. Las células en fase estacionaria de crecimiento son más tolerantes al calor que las células en fase logarítmica. Además, la resistencia al calor de las bacterias tiende a aumentar a medida que aumenta la temperatura de incubación.

Han aparecido informes contradictorios en la literatura sobre la posibilidad de que *L. monocytogenes* pueda sobrevivir a la pasteurización de la leche. Beams y Girard (2), en 1958, fueron los primeros en demostrar que el organismo puede sobrevivir a un proceso de pasteurización a 61,7 °C durante 35 min. *Listeria* es capaz de desarrollar una resistencia al tratamiento térmico cuando se somete a periodos cortos de adaptación, denominados choques térmicos (3).

En este trabajo, nuestro objetivo ha sido lo de demostrar si esta bacteria era capaz de desarrollar una resistencia al calor tras aplicar tratamientos térmicos prolongados a temperaturas de tratamiento bajas y tratamientos térmicos cortos a temperaturas altas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Microorganismo

Se utilizó la cepa de *Listeria monocytogenes* CECT 4032, procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Se prepararon cultivos de este microorganismo en caldo de triptona y soja (TSB, Scharlab, Barcelona, España) con incubación a 37 °C durante 24 h, hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento (aprox. 10⁹ microorganismos/mL).

2.2 Determinaciones de termorresistencia

Se realizaron en un termorresistómetro Mastia (4) en caldo TSB. Una vez atemperado a la temperatura de tratamiento, se inocularon 0,2 mL del cultivo en TSB y se tomaron muestras a tiempos preestablecidos según la temperatura de tratamiento. Se utilizaron dos temperaturas de tratamiento distintas, 55 y 65 °C.

2.3 Ciclos de tratamiento térmico - crecimiento

Tras 1 hora de tratamiento a 55 °C o 1 minuto a 65 °C, correspondientes en ambos casos a una inactivación aproximada de 4 ciclos logarítmicos, se tomó una muestra de 1 mL, que se sembró en 5 mL de caldo TSB y se incubó durante 24 h a 37 °C. Tras esta incubación, el cultivo se utilizó de nuevo como inóculo para realizar un nuevo experimento en el termorresistómetro. Este ciclo de crecimiento inactivación se repitió diez veces para cada una de las temperaturas de tratamiento.

2.4 Incubación y recuento de supervivientes

En los experimentos de inactivación, para cada uno de los tiempos de muestreo se realizaron las correspondientes diluciones decimales en agua de peptona (SCharlab), se sembraron en agar de triptona y soja (TSA, Scharlab) y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Los recuentos de supervivientes se representaron en las correspondientes gráficas de supervivencia, a partir de las que se calcularon los tiempos de reducción decimal o valores *D* (tiempo necesario para inactivar a un 90% de la población de microorganismos).

2.5 Tratamiento estadístico de los resultados

Los experimentos se realizaron, al menos, por triplicado. Para cada uno de los valores *D* se calculó el coeficiente de regresión (r_0) y los intervalos de confianza para el 95% inferior y superior.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

L. monocytogenes mostró una resistencia al calor caracterizada por un valor $D_{55\text{ }^{\circ}\text{C}}$ de 15 minutos y un valor $D_{60\text{ }^{\circ}\text{C}}$ de 16 s. Cuando fue sometida a ciclos de inactivación y posterior crecimiento de los supervivientes al tratamiento térmico su valor D fue aumentando progresivamente, hasta prácticamente duplicarse a ambas temperaturas. La Fig. 1 muestra, a modo de ejemplo, las gráficas de supervivencia obtenidas a 55 °C tras 2 y 7 ciclos de inactivación-crecimiento, en las que se puede observar ese aumento de la resistencia térmica. La Fig. 2 muestra el resultado obtenido a la temperatura de 65°C, en la que también se pueden observar un efecto similar.

Entre los mecanismos de adaptación al calor, la síntesis de proteínas del choque térmico (HSPs) es uno de los más conocidos y más habituales entre las bacterias (2). Estas son sintetizadas, en tiempos tan cortos como 2 minutos, cuando los microorganismos son sometidos a tratamientos térmicos subletales. Así, la síntesis de HSPs podría explicar el aumento de resistencia observado a 55°C. Sin embargo, la inactivación a 65°C se produce de manera mucho más rápida, alcanzándose 4 ciclos logarítmicos de inactivación en aproximadamente 1 minutos. Este tiempo es demasiado corto como para permitir la síntesis de HSPs a esa temperatura, por lo que se plantea que podría haber otros mecanismos detrás del aumento de resistencia tras los ciclos de crecimiento - inactivación, al menos a temperaturas elevadas.

4. CONCLUSIONES

Estos resultados abren nuevos escenarios en relación a la pasteurización de alimentos, que debería ser capaz de prevenir que los microorganismos fueran capaces de adaptarse a las temperaturas de tratamiento. Este comportamiento se debería tener en cuenta a la hora de diseñar tratamientos térmicos efectivos para conservar alimentos, los cuales deberían evitar etapas de calentamiento innecesarias.

5. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido posible gracias al Proyecto PID2020-116318RB.C32 por parte del Ministerio de Ciencia e Innovación y de la Agencia Estatal de Investigación.

6. REFERENCIAS

1. EFSA (European Food Safety). The European Union One Health 2021 zoonoses report. EFSA J. 2022;20(12):e07666.
2. Bearns RE, Girard KF. The effect of pasteurization on *Listeria monocytogenes*. Can J Microbiol. 1958;4(1):55-61.
3. Linton RH, Pierson MD, Bishop JR. Increase in heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A by sublethal heat shock. J Food Prot. 1990;53(11):924-7.
4. Conesa R, Andreu S, Fernández PS, Esnoz A, Palop A. Nonisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia. J Appl Microbiol. 2009;107(2):506-13.

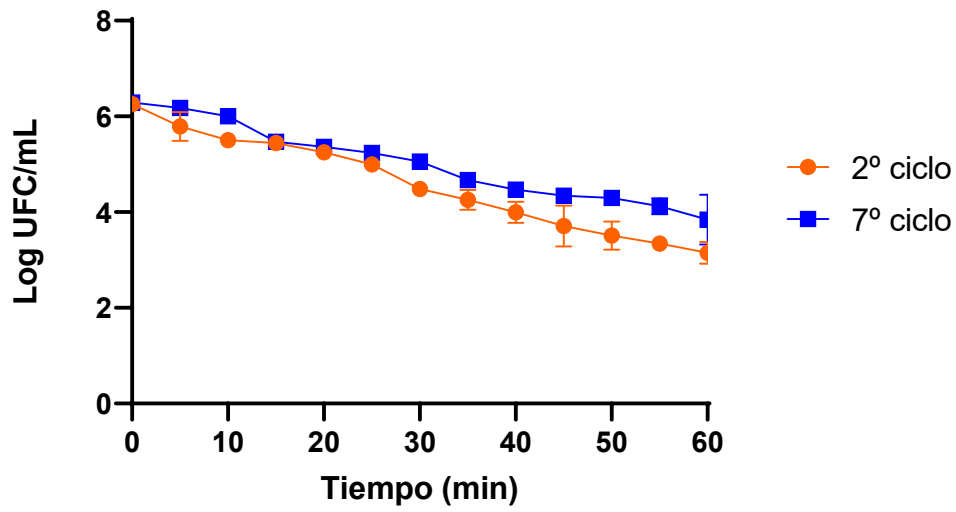


Figura 1. Supervivencia de *Listeria monocytogenes* en caldo TSB a 55°C

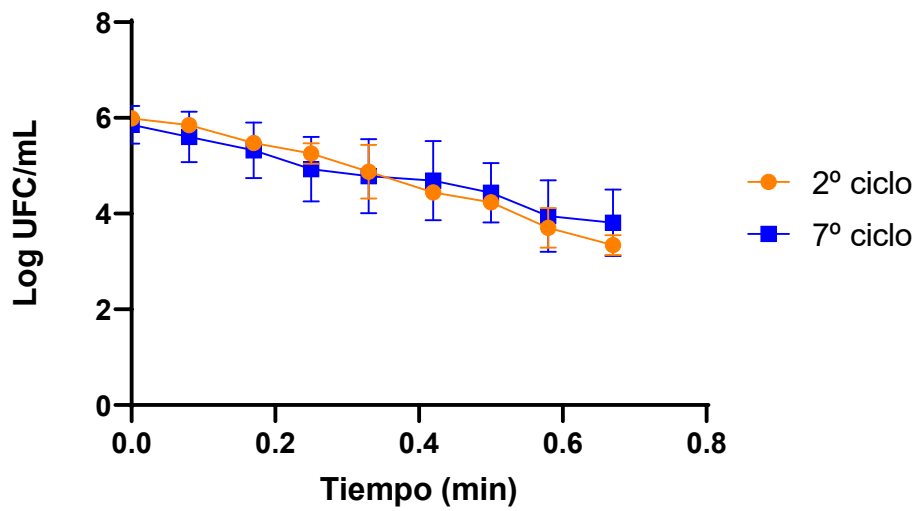


Figura 2. Supervivencia de *Listeria monocytogenes* en caldo TSB a 65°C

Optimización de la extracción de compuestos bioactivos de subproductos de brócoli mediante ultrasonidos

Optimization of the extraction of bioactive compounds from broccoli by-products by ultrasounds

H. Seyedehzeinab^{1*}, L. Martínez-Zamora^{1,2}, M. Cano-Lamadrid¹, F. Artés-Hernández¹

¹Grupo de Postrecolección y Refrigeración, Departamento de Ingeniería Agronómica e Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

²Departamento de Nutrición y Bromatología, Universidad de Murcia. Campus de Espinardo, 30100, Murcia, España.

*seyedehzeinab.hashemi@edu.upct.es

Resumen

Aproximadamente el 50% de los subproductos de brócoli tras su cosecha son hojas. Dichas hojas tienen mayor contenido de compuestos fenólicos totales (TPC), actividad antioxidante total (TAC), clorofilas y vitaminas (E y K) que los floretes o los tallos, mientras que su contenido en glucosinolatos (GLS) es prácticamente el mismo. Debido a la acción de la mirosinasa, los GLS son transformados a isotiocianatos, principales compuestos bioactivos en las *Brassicas*. Se biosintetizan y tienen importantes propiedades anticancerígenas y antimutagénicas. El objetivo del presente trabajo fue optimizar la mezcla de solventes para obtener una mayor extracción de TPC en hojas de brócoli. Se probaron diferentes concentraciones de etanol y agua, donde se puso de manifiesto que una elevada proporción de agua en la mezcla logró las mayores extracciones de compuestos fitoquímicos, recomendándose 25% etanol + 75% agua.

Palabras clave: Brásicas; reutilizar; pérdida de alimentos; fitoquímico; US; antioxidantes.

Abstract

Around 50% of broccoli by-products at harvest are leaves. Such leaves have higher total phenol content (TPC), antioxidant activity (TAC), chlorophylls and vitamins (E and K) than florets or stems, while their glucosinolate (GLS) content is almost similar. Due to myrosinase activity, GLS are transformed in isothiocyanates, the main bioactive compounds in Brassica. They are biosynthesized and have strong anti-cancer and anti-mutagenic properties. The objective of present word was to optimize the mix of solvents to obtain a better extraction of TPC from broccoli leaves. After mixing different concentration of ethanol and water, we concluded that a high proportion of water in the mix achieved the best extraction of phytochemical compounds, recommending 25% ethanol + 75% water.

Keywords: Brassica; re-use; food loss; phytochemicals; US; antioxidants.

1.INTRODUCCIÓN

Harvesting broccoli produces many by-products, which most of them are leaves and stems. About half of the total biomass of the broccoli plant is made up of leaves, so it is a huge amount that deserves to be revalorized. Broccoli leaves have important values of total phenol content (TPC), antioxidant activity (TAC), Chlorophylls, and vitamins (E and K), higher than those find in stems, while their glucosinolate (GLS) content is similar [1]. GLS are the main bioactive compounds found in Brassica, from which Isothiocyanates (ITC) are biosynthesized and have strong anticancer and antimutagenic properties [2]. Glucoraphanin and glucobrassicin are the

main GLS found in broccoli (*Brassica Oleracea* var. *italica*) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), while glucobrassin and sinigrin are in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) [3].

From brassica family wastes from non-edible parts of these vegetables such as (root, stem, florets, or even pulp obtained from processing) can be obtained from plant nutrients such as pectin and dietary fiber as well as pigments including carotenoids.

In this sense, the objective of the present work has been to optimize the extraction of some of those phytochemicals from broccoli leaves using ultrasounds (US) and environmentally friendly solvents (ethanol and water).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Plant material

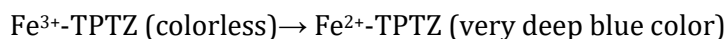
Broccoli leaves were harvested and supplied by Grupo Lucas (El Raal, Murcia, Spain) in November 2022. After washing, freeze-dried, and milled ($\emptyset < 1$ mm), 0.5 g of freeze-dried broccoli leaves were disposed into glasses. Then, 10 mL of solvent were added to every glass (Table 1). After mixing, all samples were put in an US bath (Bandelin, Berlin, Germany) for 15 minutes at 25°C. When finished, we checked the temperature. Samples were filtered and then, analysis of TPC and TAC were performed. All analysis were carried out in triplicate.

2.2 Total Phenolic Compounds

The spectrophotometric method developed by Folin and Ciocalteu [4] for the determination of TPC is based on its reducing character and is the most used. A mixture of phosphopholphramic and phosphomolybdic acids is used as reagent in basic medium, which are reduce by oxidizing phenolic compounds. Originating blue oxides of tungsten (W_8O_{23}) and molybdenum (Mo_8O_{23}). The absorbance of the developed blue colour is measured at 765 nm. Results were expressed as g GAE/ kg fresh weight (fw).

2.3 Total Antioxidant Capacity

TAC was determined using the method based on Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure to quantify antioxidant power. This technique is based on the measurement of the ability of the compounds under study to be oxidized by iron [5]. The complex formed by Fe^{3+} . TPTZ is reduced to a bluish ferrous-tripyridyl triazine ion complex. This reaction in a medium of low pH, produces a bluish color whose intensity will tell us about the antioxidant capacity of the product:



The absorbance of the developed blue colour is measured at 593 nm. Reaction time was 30 min. Results were expressed in g Trolox/ kg fw.

2.4 Statistical analyses

The experiment was a one-factor (solvent) design subjected to analysis of variance (ANOVA) using Statgraphics Plus software (v. 5.1. Statpoint Technologies. Inc. Warrenton. VA. USA). Statistical significance was assessed at the level $*p < 0.05$, and Tukey's multiple range test was used to separate means.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Regarding the extraction of TPC the best result was obtained by the mix of 25% ethanol + 75% water and 50% ethanol + 50%, without differences among them, reaching a maximum of 12.29 g GAE/ kg fw. When 100% ethanol or 75% ethanol + 25% water was used, we obtained the lowest TPC with 3.20 g GAE/ kg fw and 2.24 g GAE/ kg fw. It was reported 8.92 g GAE/ kg fw when 100% water was used and 12.17 g GAE/ kg fw for a mix of 25% ethanol + 75% water.

According to the TAC by FRAP, the best result was obtained with 25% ethanol + 75% water, reaching the highest ability to reduce metals reporting 16.19 g Trolox/ kg fw. When 100% ethanol was used, we obtained the lowest TAC with 5.77 g Trolox/ kg fw. However, we achieved a reasonable extraction when we used 100% water with 11.44 g Trolox/ kg fw, which was quite similar to the 12.03 g Trolox/ kg fw obtained for the mix 75% ethanol + 25% water. When 100% ethanol was used, the lowest ability to reduce metals and TPC was obtained.

Gudiño et al. (2022) evaluated different broccoli by-products as sources of bioactive compounds, they recommended 80% ethanol + 20% water for dried broccoli leaves, reaching a higher TAC and chlorophyll content, while reporting a TPC of 24.3 mg GAE/ kg dry weight (dw), which is in concordance with our values presented in fw .

4. CONCLUSIONS

For an efficient and sustainable extraction of phytochemicals of broccoli leaves by-products, the best solvent to use is 75% water + 25% ethanol. Our results are a first step into optimizing the maximum water able to reach maximum extraction due to be a cheap and easy to handle 'Green solvent'.

5. ACKNOWLEDGMENTS

Project PID2021-1238570B-I00 financed by the Spanish Ministry of Science and Innovation MCIN, the Spanish State Research Agency/10.13039/501100011033/and FEDER. This work is a also a result of the AGROALNEXT programme and was supported by MCIN with funding from NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) and by Fundación Séneca with funding from CARM. L.M.-Z. contract has been financed by the Program for the Re-qualification of the Spanish University System, Margarita Salas modality, by the University of Murcia. The M.C.-L. contract has been co-financed by Juan de la Cierva-Formación (FJC2020-043764-I) from the Spanish Ministry of Education.

6. REFERENCES

1. Formica-Oliveira, A.C.; Martínez-Hernández, G.B.; Díaz-López, V.; Artés, F.; Artés-Hernández, F. Effects of UV-B and UV-C Combination on Phenolic Compounds Biosynthesis in Fresh-Cut Carrots. *Postharvest Biol. Technol.* 2017, 127, 99–104.
2. Ho, E.; Clarke, J.D.; Dashwood, R.H. Dietary Sulforaphane, a Histone Deacetylase Inhibitor for Cancer Prevention. *J. Nutr.* 2009, 139, 2393–2396.
3. Drozdowska, M.; Leszczynska, T.; Koronowicz, A.; Piasna-Słupecka, E.; Dziadek, K. Comparative Study of Young Shoots and the Mature Red Headed Cabbage as Antioxidant Food Resources with Antiproliferative Effect on Prostate Cancer Cells. *RSC Adv.* 2020, 10, 43021–43034.
4. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965;16(3).
5. Castillejo N, Martínez-Hernández GB, Monaco K, Gómez PA, Aguayo E, Artés F, et al. Preservation of bioactive compounds of a green vegetable smoothie using short time-high temperature mild thermal treatment. *Food Sci Technol Int.* 2017;23(1):46–60.

Table 1. Sampling code.

Code Sample	Ethanol	Water
100 EtOH	100%	0%
100 H ₂ O	0%	100%
50 EtOH+50 H ₂ O	50%	50%
75 EtOH+25 H ₂ O	75%	25%
25 EtOH+75 H ₂ O	25%	75%

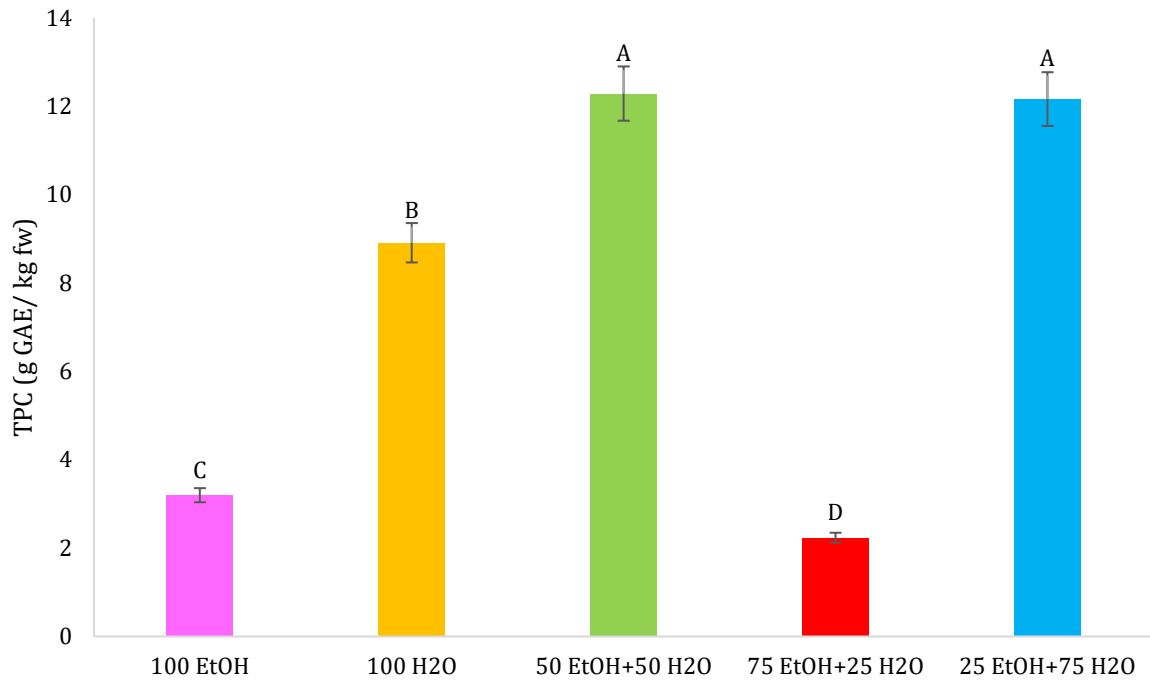


Figure 1. Total phenolic content (TPC) of Broccoli leaves by-products extracted with different solvent mixing including water + ethanol. Different letters show significant differences ($p<0.05$).

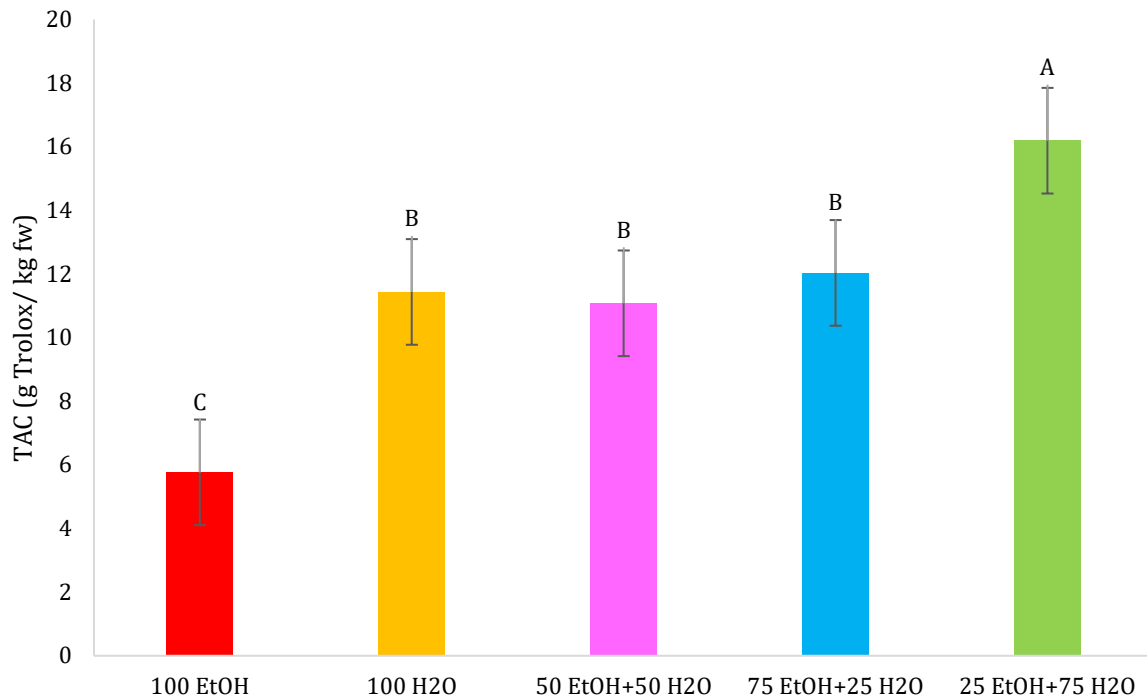


Figure 2. Total antioxidant capacity (TAC) measured by FRAP method of Broccoli leaves by-products extracted with different solvent mixing including water + ethanol. Different letters show significant differences ($p<0.05$).

Caracterización de complejos de inclusión aceites esenciales/ β -ciclodextrina en envases activos

Characterization of inclusion complexes essential oils/ β -cyclodextrin in active packaging

A. Navarro-Martínez*, G.B. Martínez Hernández, A. López-Gómez

Grupo de Ingeniería del Frío y la Seguridad Alimentaria, Departamento de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

*alejandra.navarro@upct.es

Resumen

La encapsulación de aceites esenciales (AEs) mediante complejos de inclusión en β -ciclodextrina es una tecnología eficiente y bajo coste, para conseguir una liberación controlada de AEs desde los envases activos. Este estudio determinó la concentración del complejo de inclusión AEs/ β -CD en diferentes zonas después de la impresión sobre las láminas de cartón (mediante UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) y caracterizó su morfología mediante microscopio electrónico de barrido (SEM). La concentración de complejo alcanzada en las láminas activas fue de 803,1 y 937,1 mg/m² en zonas de alta concentración de complejo con y sin adhesivo, respectivamente. En el caso, de zonas de baja concentración, ésta fue de 342,9 y 480,6 mg/m² para las zonas con y sin adhesivo, respectivamente. En las imágenes obtenidas mediante SEM se observó la morfología de las partículas. Los resultados concluyeron que la concentración de complejo, así como su morfología fue óptima para asegurar una liberación controlada.

Palabras clave: complejo de inclusión; envases activos; β -ciclodextrina; aceites esenciales; microscopía electrónica de barrido.

Abstract

The encapsulation of essential oils (EOs) by means of inclusion complexes in β -cyclodextrin is an efficient and low-cost technology to achieve a controlled release of EOs from active containers. This study determined the concentration of the AEs/ β -CD inclusion complex in different areas after printing on the cardboard sheets (using UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography)) and characterized its morphology using scanning electron microscope (SEM). The concentration of complex reached in the active sheets was 803.1 and 937.1 mg/m² in areas of high concentration of complex with and without adhesive, respectively. In the case of areas of low concentration, this was 342.9 and 480.6 mg/m² for the areas with and without adhesive, respectively. In the images obtained by SEM the morphology of the particles was observed. The results concluded that the concentration of complex, as well as its morphology, was optimal to ensure a controlled release.

Keywords: inclusion complex; quality; β -cyclodextrin essential oils; scanning electron microscopy.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se estiman unas pérdidas/desperdicio del 45-55 % de frutas y hortalizas (1). El etileno, conocido como la hormona de la maduración en las plantas y sus frutos, es clave en los mecanismos que controlan el crecimiento y desarrollo de las plantas. Por otro lado, el perfil

del consumidor actual se caracteriza por exigir productos naturales saludables sin aditivos, seguros y con una larga vida útil (2).

Los aceites esenciales (AEs) son extractos naturales de plantas, ampliamente aceptados por el consumidor, los cuales poseen elevadas propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Son capaces de reducir la producción de etileno en frutas y hortalizas (3).

Para ello, las ciclodextrinas (CD) son capaces de encapsular una amplia gama de moléculas en su interior, formando un complejo de inclusión (4). Así, gracias a la naturaleza anfifílica de las CD (es una molécula tronco-cónica con un interior hidrófobo y un exterior hidrofílico) son capaces de hacer "solubles" los AEs en agua para su incorporación en envases activos y posterior liberación controlada. Así, los AEs son las moléculas "huésped" mientras que las CD son las moléculas "anfitrionas"(4). Así, es necesario cuantificar la cantidad de complejo de inclusión cargado en el envase activo, así como la morfología para así poder determinar la idoneidad de dichos envases activos que liberen la cantidad de AEs necesaria.

Los objetivos de este estudio fueron cuantificar la cantidad de complejo de inclusión en el envase activo a nivel industrial para realizar un control de calidad de dicha concentración y observar la morfología de éstos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Extracción y análisis de β -CD en los envases activos de cartón

Se analizaron zonas de los envases activos donde se observaba visualmente que había habido una impresión del complejo activo superior que, en otras zonas, así como zonas donde se había aplicado adhesivo de contacto para formar los envases (barquetas) activos. Para ello, se cortaron muestras de envase de cartón activo de 20×20 cm, los cuales a su vez se trocearon en cuadrados de 2×2 cm, que se colocaron en un bote de cristal (tipo Pyrex) de 100 mL de capacidad. Seguidamente se añadieron 40 mL del extractante (acetoneitrilo:agua, 50:50 (volumen (v):v)) y se cerró el bote de cristal. Después se incubaron durante una hora a 85 ° C en un baño de agua agitado a 60 rpm. Seguidamente, se dejó enfriar y se realizaron dos ciclos de 5 min de ultrasonidos (100 % de frecuencia). Finalmente, el extracto se filtró a 0,22 μ m mediante filtros de jeringa (6).

El extracto obtenido se analizó mediante cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UHPLC) con las siguientes condiciones: columna UHPLC para azúcares (Shodex Asahipak NH2P-50 4E; 4.6mm×250mm;2 μ m), detector de índice de refracción, fase móvil acetoneitrilo:agua (60:40, v:v), flujo isocrático de 1 mL/min, temperatura columna de 40 ° C y tiempo de análisis de 23 min.

2.2 Análisis del complejo de inclusión por microscopía electrónica de barrido (SEM).

La morfología de las β -CD y los complejos de inclusión AEs/ β -CD fue analizada utilizando un microscopio electrónico de barrido (modelo S-3500N Hitachi). Previamente a su observación, las muestras se recubrieron con una película delgada de platino y se analizaron a un aumento de 200 nm.

2.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software SPSS (v.19 IBM, Nueva York, EE. UU.) utilizando análisis de varianza multifactorial (ANOVA) con la prueba de Tukey ($p = 0,05$).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se puede observar en la figura 1 que no existieron diferencias ($p > 0.05$) significativas entre las con adhesivo y sin adhesivo, tanto en las zonas con alta como de baja concentración de complejo. Sin embargo, sí hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las zonas con alta concentración y baja concentración. La concentración de complejo obtenida fue de 803,1 y 937,1 mg/m² en zonas de alta concentración con y sin adhesivo, respectivamente, y a nivel industrial se

añaden entre 1000 y 1200 mg/m². Estas láminas activas se pueden usar en la fabricación de cartón ondulado (3 capas) o usar la lámina activa de papel en el fondo de cajas de plástico. Por lo que el análisis realizado fue de la ciclodextrina y junto con el AE que fueron 105,7 y 123,3 mg/m² (datos no mostrados) sumarian 908,8 y 1060,4 mg/m² en total, correspondiéndose así con la concentración que se aplica en la fabricación a nivel industrial de las láminas activas. Y obteniendo un resultado óptimo en el control de calidad que corrobora que las láminas activas contienen dicha concentración de complejo. Los valores obtenidos fueron superiores que los que obtuvieron (7). En comparación con estudios anteriores se puede garantizar que se produce una liberación controlada en el tiempo de la concentración que se añade de complejo a las láminas de cartón, por ejemplo, en un estudio con limón se añadió 800 mg/m² (8).

En la Figura 2, podemos observar las distintas imágenes obtenidas por el microscopio electrónico de barrido en las que se ven las partículas correspondientes a los complejos de inclusión muy compactados. Las imágenes son parecidas a las obtenidas por (9), en la cuales se observa un tamaño de partícula homogéneo, garantizando así que el proceso de fabricación del complejo fue óptimo.

4. CONCLUSIONES

El método de caracterización mediante análisis en UHPLC resultó óptimo, debido a que la concentración obtenida concuerda con la añadida a nivel industrial. La observación con el microscopio electrónico de barrido mostró unos complejos de inclusión de tamaños y morfología homogéneas en la escala nanométrica.

5. AGRADECIMIENTOS

Quería agradecer a mi director de Tesis Antonio López Gómez por brindarme esta oportunidad y a mi codirector Ginés Benito Martínez Hernández por guiarme en este camino tan apasionante. Los autores agradecen la financiación recibida por el proyecto PID2020-119882RB-I00 financiada por MCIN/AEI/10.13039/501100011033.

6. REFERENCIAS

1. Thompson J, Mitchell FG, Kasmire RF. Cooling horticultural commodities. In: Postharvest technology of horticultural crops. University of California, Agriculture and Natural Resources; 2002. p. 111–30.
2. AECOSAN. Las tendencias del consumo y del consumidor en el siglo XXI. 2018.
3. Navarro-Martínez A, López-Gómez A, Benito Martínez-Hernández G. Potential of Essential Oils from Active Packaging to Highly Reduce Ethylene Biosynthesis in Broccoli and Apples. *ACS Food Sci & Technol*. 2021 Jun 10;1(6):1050–8.
4. Lvov Y, Abdullayev E. Functional polymer-clay nanotube composites with sustained release of chemical agents. *Prog Polym Sci*. 2013;38(10–11):1690–719.
5. Marques HMC. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour Fragr J*. 2010 Sep;25(5):313–26.
6. Padukka I, Bhandari B, D'arcy B. Evaluation of various extraction methods of encapsulated oil from β -cyclodextrin-lemon oil complex powder. *J Food Compos Anal*. 2000;13(1):59–70.
7. Chen D, Jiang S, Chen Y, Hu Y. HPLC determination of sertraline in bulk drug, tablets and capsules using hydroxypropyl- β -cyclodextrin as mobile phase additive. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2004 Jan 27 [cited 2023 Apr 12];34(1):239–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708503004862>
8. López-Gómez A, Navarro-Martínez A, Martínez-Hernández GB. Effects of essential oils released from active packaging on the antioxidant system and quality of lemons during cold storage and commercialization. *Sci Hortic (Amsterdam)*. 2023 Mar 15;312:111855.
9. Ren X, Yue S, Xiang H, Xie M. Inclusion complexes of eucalyptus essential oil with β -cyclodextrin: preparation, characterization and controlled release. *J Porous Mater* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2023 Feb 8];25(6):1577–86. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10934-018-0571-x>

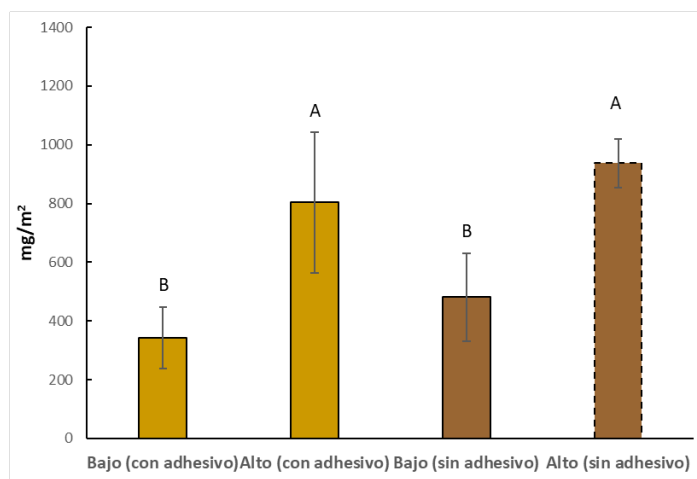


Figura 1. Concentración de β -CD (mg/m^2) en láminas de baja y alta concentración de complejo activo, y zonas con y sin adhesivo de contacto. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre diferentes concentraciones de complejo.

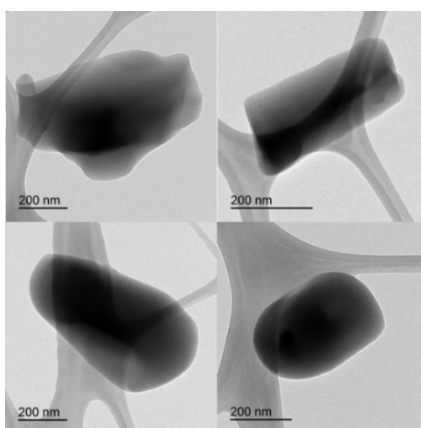


Figura 2: Imágenes obtenidas del microscopio electrónico de barrido de los complejos de β -CD con un aumento de 200 \times . Imágenes de diferentes partículas del complejo.

Simulación *in vitro* de la liberación del huésped del complejo de inclusión AOVE- α CD

In vitro simulation of the release of the guest from the AOVE- α CD inclusion complex

Barón-Yusty*, M. Ros-Chumillas, G.B. Martínez-Hernández, A. López-Gómez

Grupo de Ingeniería del Frío y la Seguridad Alimentaria, Departamento de Ingeniería Agronómica, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

*marta.baron@edu.upct.es

Resumen

Cuando un complejo de inclusión con ciclodextrina entra en contacto con la saliva, el huésped contenido en su interior puede ser liberado. Durante la masticación, la ciclodextrina se mezcla con la saliva en la boca, provocando la hidratación de la ciclodextrina y la desestabilización del complejo de inclusión. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la liberación en saliva artificial del huésped aceite de oliva virgen extra (AOVE) del complejo de inclusión con alfa-ciclodextrina (α CD), con el fin de evaluar su potencial aplicación en la industria alimentaria de productos empanados. Se observó una liberación gradualmente rápida del AOVE (liberación del 100% en menos de 1 min), lo que permitiría que el AOVE liberado sea percibido por los receptores del gusto en la cavidad bucal. Este fenómeno ha demostrado la idoneidad de emplear AOVE- α CD en la formulación de productos alimentarios empanados, para disminuir el contenido de aceite en estos productos y evitar el proceso de fritura.

Palabras clave: Saliva artificial; disolución; producto empanado; fritura; cavidad bucal.

Abstract

The process of releasing of the encapsulated compounds from the cyclodextrin inclusion complex into the oral cavity is known as guest mouth-release. This occurs when cyclodextrin is mixed with saliva during chewing, resulting in the hydration of cyclodextrin and destabilization of the inclusion complex. In this study, the objective was to assess the release of extra virgin olive oil (EVOO) as guest from the inclusion complex with alpha-cyclodextrin (α CD) in artificial saliva, with the aim of determining its potential application in the food industry for breaded products. The results revealed a rapid release of EVOO (100% release in less than 1 minute), which would be perceived by taste receptors in the oral cavity. This finding indicates that EVOO- α CD could be used in the formulation of breaded food products, for reducing its oil content and avoid the frying process.

Keywords: Artificial saliva; dissolution; breaded product; frying; oral cavity.

1. INTRODUCCIÓN

Las ciclodextrinas (CD) son oligosacáridos cíclicos de forma toroidal formados por 6-8 unidades de glucopiranosas. Debido a su estructura tridimensional, poseen la capacidad de encapsular en su interior parcial o totalmente moléculas hidrofóbicas de otros compuestos, formando complejos de inclusión (1). Estas moléculas albergadas en su interior se denominan huéspedes y pueden ser protegidas y liberadas de manera controlada por las ciclodextrinas. Esta habilidad de protección mejora la solubilidad y estabilidad de las moléculas huéspedes, lo que

hace que las CD sean una herramienta versátil en una amplia variedad de aplicaciones industriales y farmacéuticas (2).

Actualmente, las CD se emplean en la industria alimentaria para encapsular compuestos lipofílicos sensibles a la degradación como sabores, aromas, colorantes y grasas. Al entrar en contacto con la saliva las CD pueden tener un papel dual en la percepción de sabores en boca. Se pueden emplear para proteger o enmascarar sabores o aromas indeseables, reduciendo su percepción sensorial y así mejorar la aceptabilidad del producto final (3). Contrariamente, pueden liberar gradualmente el sabor o aroma encapsulado sintiéndose en los receptores gustativos en la lengua, y así crear determinadas sensaciones en boca del consumidor. Una vez que los productos encapsulados en CD se mastican y entran en contacto con la saliva en la boca, las CD se disuelven lentamente debido a su naturaleza hidrosoluble, lo que permite que el huésped (sabor o aroma encapsulado) se libere y sea percibido por el consumidor. Este fenómeno es en algunos casos inevitable, incluso cuando se emplean las CD para enmascarar sabores desagradables como ocurre, por ejemplo, cuando se administra un fármaco por vía oral (3-5).

En este estudio se ha investigado la liberación en boca del aceite de oliva virgen extra (AOVE) microencapsulado en α CD mediante el uso saliva artificial, para evaluar su aplicación en la industria alimentaria, concretamente en la elaboración de platos preparados empanados. El objetivo de esta investigación era simular la disolución del complejo de inclusión AOVE- α CD en saliva artificial para ver si se tendría en boca la suficiente sensación del AOVE libre, y de esta manera reducir considerablemente el contenido de aceite del producto empanado, pudiendo evitar la prefritura y la fritura posterior de preparación para su consumo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

El pan rallado de maíz fue suministrado por la empresa Fripozo S.A (Las Torres de Cotillas, Murcia, España). El complejo AOVE- α CD (en polvo) fue preparado y suministrado por la empresa Bioencapsulation and iPackaging S.L. (Fuente Álamo, Murcia, España).

2.2 Análisis de la liberación en saliva artificial del AOVE microencapsulado en α CD

La liberación del huésped del complejo de inclusión AOVE- α CD se estudió siguiendo el método descrito por Celebioglu y Uyar (2020) con algunas modificaciones (4). Se empleó la técnica de disolución por saliva artificial, que se formuló con la siguiente composición: 1,19 g NaH_2PO_4 , 0,095 g KH_2PO_4 , y 4 g NaCl, en 500 mL de agua destilada, ajustando el pH a 6,8 con ácido fosfórico. Para la evaluación de esta liberación, se introdujeron 10 mL de saliva artificial en una placa Petri y seguidamente se depositaron 0,5 g de la muestra a analizar. En placas distintas se analizó por un lado el comportamiento del complejo AOVE- α CD solo; por otro, el pan rallado de maíz, y por otro la mezcla de AOVE- α CD y pan rallado de maíz (mezclados en una proporción 1:2, *p:p*). El comportamiento de disolución se registró realizando tomas de fotos durante 60 s en intervalos de 15 s.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tan pronto como se añadió la muestra de AOVE- α CD en la saliva artificial, se observó una liberación parcial del AOVE en la placa Petri (Figura 1). De manera análoga, se percibe este fenómeno en la muestra de pan rallado con AOVE- α CD. Sin embargo, la muestra con solamente pan rallado no se altera a lo largo de la duración del ensayo, como era de esperar. A medida que aumenta el tiempo de contacto, el AOVE (huésped) se va liberando en su totalidad, tanto en la muestra de AOVE- α CD como en la muestra de AOVE- α CD con pan rallado de maíz. Esto se atribuye a que una vez que las ciclodextrinas se disuelven en saliva, pueden liberar los compuestos hidrófobos que previamente habían sido incluidos en su cavidad hidrófoba, en este caso el AOVE.

En efecto, la cavidad hidrófoba de las ciclodextrinas tiene afinidad por el AOVE, y al disolverse en saliva, la cavidad hidrófoba se expone al medio acuoso de la saliva, lo que provoca que los compuestos hidrófobos (el aceite AOVE) sean liberados y se dispersen en la saliva. Como resultado, el complejo AOVE- α CD se disuelve completamente en la saliva en menos de 45 s de contacto. Celebioglu y Uyar (2020) investigaron el comportamiento de disolución de complejos de inclusión de curcumina + HP- β CD y curcumina + HP- γ CD en redes nanofibras electrohiladas. Los complejos de inclusión se disolvieron en pocos segundos tanto en agua como en papel de filtro empapado de saliva, lo que se indicó por la coloración anaranjada del agua y la rápida disolución en papel de filtro empapado de saliva (4). Así mismo, Topuz y sus colaboradores (2021) (4,5) llevaron a cabo pruebas de disolución de complejos de inclusión de HP- β CD con varios antibióticos. Los resultados mostraron que los complejos se disolvieron en segundos al entrar en contacto con saliva artificial, demostrando su potencial para la administración oral de fármacos.

4. CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que se logró liberar adecuadamente, de forma gradual, en saliva artificial el AOVE del complejo de inclusión AOVE- α CD, lo que evidencia su potencial para ser utilizado en alimentos con contenido reducido de aceite. La liberación gradual en la boca permitirá disfrutar del sabor y aroma del aceite durante la masticación de productos alimenticios que contengan el complejo de inclusión. De este modo, se podrá ajustar el contenido de aceite (grasa) en el producto empanado, evitando procesos que incrementan de forma excesiva el contenido de aceite en el producto, como son la prefritura y la fritura en baño de aceite hirviente. Así, este tipo de encapsulado contribuirá a la formulación de alimentos o platos preparados más saludables, pero con todo su sabor.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la empresa Fripozo S.A. a través del Proyecto CDTI IDI-20190627, y del contrato correspondiente con la Universidad Politécnica de Cartagena, que ha financiado la beca predoctoral de la autora de este trabajo Marta Barón.

6. REFERENCIAS

1. Szente L, Szejtli J. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends Food Sci Technol*. 2004 Mar 1;15(3-4):137-42.
2. Hădărugă NG, Bandur GN, David I, Hădărugă DI. A review on thermal analyses of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. Vol. 17, *Environmental Chemistry Letters*. Springer Verlag; 2019. p. 349-73.
3. Szejtli J, Szente L. Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. Vol. 61, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Elsevier; 2005. p. 115-25.
4. Celebioglu A, Uyar T. Fast-dissolving antioxidant curcumin/cyclodextrin inclusion complex electrospun nanofibrous webs. *Food Chem*. 2020 Jul 1;317:126397.
5. Topuz F, Kilic ME, Durgun E, Szekely G. Fast-dissolving antibacterial nanofibers of cyclodextrin/antibiotic inclusion complexes for oral drug delivery. *J Colloid Interface Sci*. 2021 Mar 1;585:184-94.

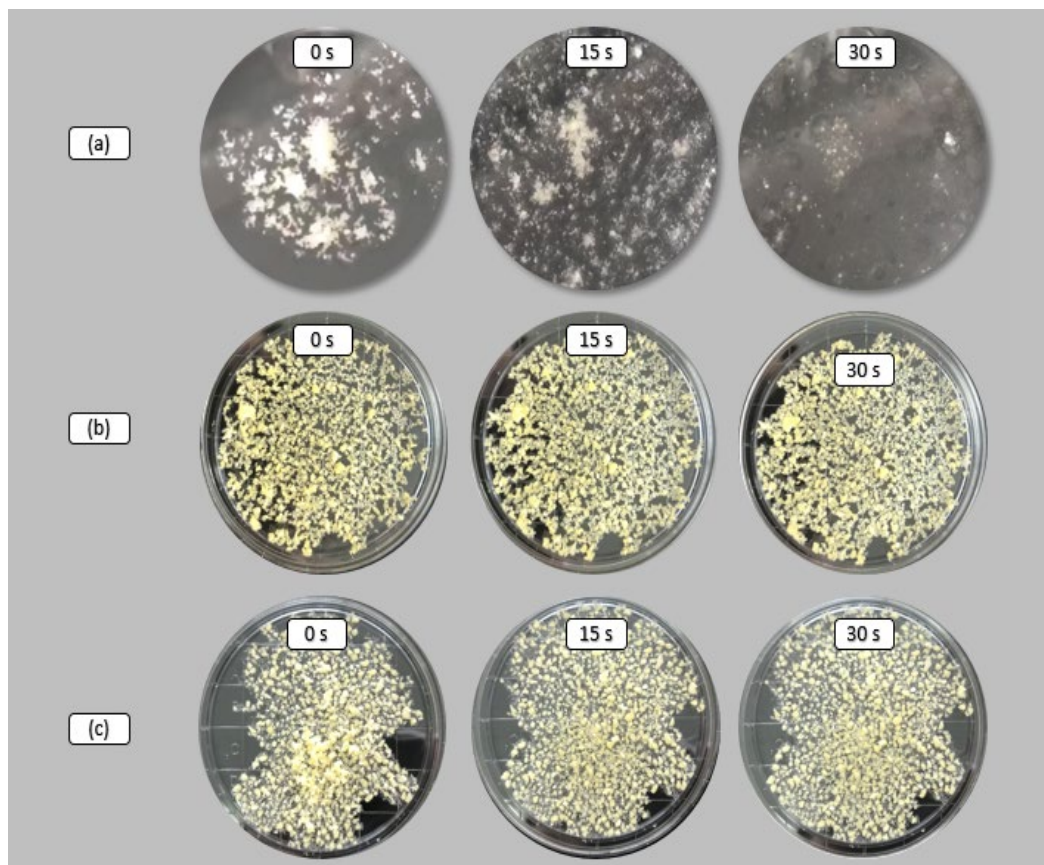


Figura 1. Comportamiento de disolución del (a) AOVE- α CD, (b) pan rallado de maíz, y (c) pan rallado + AOVE- α CD, al entrar en contacto con saliva artificial a diferentes tiempos de contacto: 0 s, 15 s y 30 s.

Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de vinagres de alto contenido en ácido acético

Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activity of vinegars with a high acetic acid content

M.Á. Martínez-Sánchez*, M. Barón-Yusty, G.B. Martínez-Hernández, A. López-Gómez

Grupo de Ingeniería del Frío y la Seguridad Alimentaria, Departamento de Ingeniería Agronómica, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

*mariadelosangeles.martinez@edu.upct.es

Resumen

El presente estudio investigó la caracterización fisicoquímica, antioxidante y antimicrobiana de vinagres de vino, manzana y alcohol con alto contenido en ácido acético (> 8%). El contenido en polifenoles y la actividad antioxidante fueron analizadas mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu y el ensayo de eliminación de radicales libres DPPH, respectivamente. La actividad antimicrobiana se llevó a cabo mediante el método de difusión en pozos contra bacterias gram positivas y gram negativas. El vinagre de vino tinto presentó las capacidades antioxidantes más altas, mientras que el vinagre de alcohol no presentó contenido fenólico ni antioxidante. Todas las tipologías de vinagre exhibieron una actividad antimicrobiana alta, con una zona de inhibición de 17,5-33,9 mm; incluso superior al antibiótico comercial investigado. Se halló que el vinagre de vino tinto, vino blanco y manzana son ricos en compuestos fenólicos y son potentes como agentes antioxidantes y antimicrobianos; evidenciando su elevada funcionalidad tecnológica.

Palabras clave: vino; antioxidante; polifenoles; Kirby-Bauer; antimicrobiano.

Abstract

The aim of this study was to investigate the physicochemical, antioxidant and antimicrobial characteristics of vinegar from red and white wine, apple and alcohol containing high acetic acid values (> 8%). Total phenolic content and antioxidant activity were determined using the Folin-Ciocalteu method and DPPH free radical-scavenging activity assay, respectively. Antimicrobial activity was evaluated against Gram-positive and Gram-negative bacterial strains by well-diffusion method. Red wine vinegar showed the highest antioxidant properties, while alcohol vinegar did not have phenolic content or antioxidant activity. All vinegar samples exhibited significant antimicrobial activity with an inhibition zone diameter of 17,5-33,9 mm; even superior to the commercial antibiotic assayed. These results revealed the high ability of red and white wine and apple vinegar as antioxidant and antimicrobial agents due to their elevated phenolic content and antioxidant activity.

Keywords: wine; antioxidant; polyphenols; Kirby-Bauer; antimicrobial.

1. INTRODUCCIÓN

El vinagre es una solución líquida producida a partir de productos de origen vegetal por una doble fermentación alcohólica y acética. Su componente principal es el ácido acético y su concentración está contenida dentro del 3-5% (peso:volumen) (1). Su composición es dependiente tanto de la materia prima como de la tecnología empleada para su producción. Principalmente, su elaboración se realiza utilizando frutas (uva, manzana) como base, aunque también se pueden utilizar otras materias primas como cereales (arroz) o incluso alcohol.

Tradicionalmente, el vinagre se ha empleado como condimento y como conservante de alimentos, consecuencia de su contenido en compuestos bioactivos: ácidos orgánicos y polifenoles, entre otros. Los compuestos naturales bioactivos han tenido un marcado auge a raíz de la preferencia del consumidor de lo natural frente a lo sintético. Estos compuestos tienen gran influencia en las características organolépticas del vinagre, pero también juegan un papel crucial en sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas (2). Estas propiedades tecnológicas del vinagre lo convierten en un producto útil y efectivo como conservante y estabilizante de alimentos. Así pues, a fin de identificar nuevos formatos de vinagre para uso alimentario se evalúa la tipología de vinagre con mayor calidad funcional tecnológica en vinagres de alto contenido en ácido acético.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Vinagre de vino tinto, vino blanco, manzana y alcohol fueron suministrados por la empresa JR Sabater S.A. (Cabezo de Torres, Murcia, España). *Listeria monocytogenes* CECT 4032 y *Salmonella enterica* CECT 443 fueron proporcionados por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT; Valencia, España).

2.2 Determinación de las propiedades fisicoquímicas

El pH se determinó utilizando un pH-metro digital (Crison GLP 21; Barcelona, España). La titulación de los vinagres se realizó empleando NaOH 0,1 M hasta punto final de 8,1 (3). El resultado se expresó como equivalentes de ácido acético en tanto por ciento. Para la medición de sólidos solubles totales (% Brix) se utilizó un refractómetro digital portátil (Atago PAL-1; Tokio, Japón).

2.3 Análisis del contenido en polifenoles totales y actividad antioxidante

El contenido en polifenoles totales se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (4), con modificaciones. Vinagre líquido se mezcló con MeOH 50% (1:40) y se extrajo durante 1h a 120 rpm. Los resultados se expresaron como mg ácido gálico/mL. La capacidad antioxidante (μ moles Trolox/mL) se evaluó empleando este mismo extracto, mediante la actividad de captación de radicales libres por el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), con adaptaciones (5).

2.4 Efecto antimicrobiano de los vinagres

Una alícuota de 10 μ L de microorganismo se transfirió a 10 mL de caldo TSB y se incubó a 37 °C durante 20 h hasta obtener una concentración aproximada de 10^8 UFC/mL. La capacidad antimicrobiana se evaluó en base al método de los pozos en el agar de Kirby-Bauer (6), con modificaciones. Se empleó oxitetraciclina dihidrato (Sigma-Aldrich; San Luis, Misuri, EE. UU.) y agua destilada estéril como controles positivo y negativo, respectivamente. El diámetro de la zona de inhibición (en mm) se midió empleando un calibre digital.

2.5 Análisis estadístico

Para el tratamiento estadístico de los resultados se utilizó el software estadístico RStudio. El nivel de significación estadística se evaluó al 95% ($p < 0,05$) realizando un análisis unidireccional de ANOVA y la prueba Tukey HSD.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido en polifenoles y la capacidad antioxidante de los vinagres evaluados se recogen en la Tabla 1. Los vinagres de vino y manzana obtuvieron valores en un rango de 0,1-0,9 mg ácido gálico/mL. Estos valores se hallaron en concordancia con los obtenidos por Bakir y colaboradores (2017) (7) para vinagre de uva y manzana, aun siendo ligeramente superiores. No se detectó contenido fenólico en el vinagre de alcohol. Los resultados de este estudio revelaron cómo la tipología de vinagre influye en la variabilidad de los compuestos bioactivos, específicamente en el caso de los polifenoles. A su vez, las diferencias de concentración se encontraron supeditadas a la

materia prima (vino, manzana o alcohol) (8). Varios estudios han evidenciado la relación entre la función antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos, siendo más elevados en los vinagres de vino (2,8). En este estudio se observa la existencia de una relación positiva entre estas dos variables. Así pues, el vinagre de alcohol no exhibió capacidad antioxidante. El efecto antimicrobiano de todas las variedades de vinagre evaluadas demostró una gran eficacia frente a *L. monocytogenes* CECT 4032 y *S. enterica* CECT 443, con un rango de inhibición de 33,9-43,7 mm y 17,5-33,9 mm, respectivamente (Tabla 2). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en las zonas de inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* CECT 4032 entre los tratamientos aplicados y el control positivo; siendo en orden ascendente de efecto inhibitorio tinto > alcohol > blanco > manzana. La inhibición de *S. enterica* CECT 443 más acentuada la manifestó el vinagre de alcohol (19,4±0,6% acético) mostrando diferencias significativas con respecto al resto de vinagres y al control positivo. En todas las pruebas efectuadas, se halló una actividad antimicrobiana notoriamente significativa al obtenerse un diámetro de inhibición superior a 15 mm (7-10 mm, baja; 11-14 mm, media; y > 15 mm, alta inhibición) (7). Los elevados niveles de acidez que reflejan el considerable contenido de ácido acético en combinación con la elevada cantidad de polifenoles presentes en los vinagres podrían ser los responsables del marcado efecto antimicrobiano exhibido (7,8). Esta correlación fue afirmada por Bakir y colaboradores (2017) (7), quienes reportaron que los diámetros de inhibición eran obtenidos en consecuencia al desequilibrio protónico provocado por el ácido acético al disociarse en el citoplasma tras atravesar la membrana bacteriana. Estos mismos autores expusieron que el vinagre de uva y manzana (2,12-5,02% acético) presentaron un efecto medio o débil inhibitorio (diámetro de inhibición 7-14 mm) sobre *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*. En contraposición a los autores mencionados, los vinagres utilizados en este estudio presentaban un nivel de contenido de ácido acético más elevado, lo que podría explicar su efecto inhibitorio más acentuado.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron la influencia de la tipología de vinagre sobre sus características fisicoquímicas, antioxidantes y antimicrobianas. Vinagres de vino tinto, vino blanco y manzana mostraron las capacidades antioxidantes más elevadas, en consonancia con su alto contenido en polifenoles totales. Además, la elevada acidez de los vinagres estudiados contribuyó a su marcada actividad antimicrobiana frente a las dos bacterias patógenas ensayadas. Todo ello contribuyó a poner de manifiesto la notable funcionalidad tecnológica en términos antioxidantes y antimicrobianos, y a evidenciar los beneficios de su aplicación industrial en la investigación de nuevos formatos de vinagre.

5. AGRADECIMIENTOS

Este estudio experimental ha sido financiado por la empresa JR Sabater S.A y el proyecto CDTI IDI-20220259 en el que se enmarca.

6. REFERENCIAS

1. Lynch KM, Zannini E, Wilkinson S, Daenen L, Arendt EK. Physiology of Acetic Acid Bacteria and Their Role in Vinegar and Fermented Beverages. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2019;18(3):587–625.
2. Budak NH, Aykin E, Seydim AC, Greene AK, Guzel-Seydim ZB. Functional Properties of Vinegar. *J Food Sci.* 2014;79(5).
3. AOAC 942.15. Acidity (Triratable) of Fruit Products. *Journal of AOAC International.* 2000.
4. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965;16:144–58.
5. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology.* 1995;28(1):25–30.
6. Roy P, Abdulsalam FI, Pandey DK, Bhattacharjee A, Eruvaram NR, Malik T. Evaluation of antioxidant,

- antibacterial, and antidiabetic potential of two traditional medicinal plants of India: *Swertia cordata* and *Swertia chirayita*. *Pharmacognosy Res.* 2015 Sep 1;7:S57–62.
7. Bakir S, Devencioglu D, Kayacan S, Toydemir G, Karbancioglu-Guler F, Capanoglu E. Investigating the antioxidant and antimicrobial activities of different vinegars. *European Food Research and Technology.* 2017 Dec 1;243(12):2083–94.
 8. Ozturk I, Caliskan O, Tornuk F, Ozcan N, Yalcin H, Baslar M, et al. Antioxidant, antimicrobial, mineral, volatile, physicochemical and microbiological characteristics of traditional home-made Turkish vinegars. *Lwt [Internet].* 2015;63(1):144–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.003>

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas, contenido en polifenoles totales y capacidad antioxidante total de vinagres evaluados. Se muestran valores promedio (n =3) y desviación estándar.

Muestra	pH	AT (%)	SST (% Brix)	Polifenoles totales (mg ácido gálico/mL)	Capacidad antioxidante (µmoles Trolox/mL)
V. vino tinto	3,0 ± 0,1 ^{ab}	10,1 ± 0,3 ^a	8,8 ± 0,1 ^a	0,9 ± 0,1 ^a	2,8 ± 0,1 ^a
V. vino blanco	3,0 ± 0,1 ^{ab}	9,7 ± 0,2 ^a	7,8 ± 0,1 ^b	0,1 ± 0,1 ^b	0,4 ± 0,1 ^b
V. manzana	3,2 ± 0,2 ^b	8,4 ± 0,6 ^b	10,1 ± 0,2 ^c	0,5 ± 0,1 ^c	1,2 ± 0,1 ^c
V. alcohol	2,8 ± 0,1 ^a	19,4 ± 0,6 ^c	10,0 ± 0,3 ^c	0,0 ± 0,0 ^d	0,0 ± 0,0 ^d

AT = acidez titulable; SST = sólidos solubles totales; Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas (p<0,05) entre los vinagres.

Tabla 2. Diámetros de inhibición (mm) de vinagres sobre *Listeria monocytogenes* CECT 4032 y *Salmonella enterica* CECT 443. Se muestran valores promedio (n = 3) y desviación estándar.

Muestra	Diámetro zona de inhibición (mm)	
	<i>L. monocytogenes</i> CECT 4032	<i>S. enterica</i> CECT 443
Control +	26,0 ± 4,5 ^a	20,7 ± 4,5 ^a
V. vino tinto	43,7 ± 0,8 ^b	21,5 ± 0,8 ^a
V. vino blanco	36,4 ± 5,0 ^{bc}	17,5 ± 0,6 ^a
V. manzana	33,9 ± 1,0 ^c	20,1 ± 0,6 ^a
V. alcohol	42,5 ± 1,5 ^{bc}	33,9 ± 1,9 ^b

Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas (p<0,05) entre los vinagres.

Determinación de los parámetros de inactivación térmica de *Lactobacillus* spp. mediante aplicación del método de distribución de Weibull

Determination of heat-induced inactivation parameters of *Lactobacillus* spp. by application of the Weibull distribution method

M.T. Gómez-Hernández*, A. López-Gómez, G.B. Martínez-Hernández

Grupo de Ingeniería del Frío y de la Seguridad Alimentaria, Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

*migueltoomas.gomez@upct.es

Resumen

El estudio de las propiedades beneficiosas de los microorganismos probióticos no viables (paraprobióticos) se encuentra en auge tanto en el ámbito de la industria alimentaria como en el de la salud humana, por las prometedoras ventajas que presentan a nivel industrial y a nivel clínico. Para obtener microorganismos no viables que retengan dichas propiedades, es necesario determinar las condiciones de inactivación que permitan optimizar este procedimiento. En este ensayo estudiamos el proceso de inactivación mediante tratamiento térmico de dos cepas de *Lactobacillus rhamnosus* y *L. acidophilus* crecidas en condiciones de fermentación. A 75°C ambos microorganismos probióticos pudieron ser inactivados completamente en periodos cortos de tiempo (8-10 min), siguiendo un modelo de distribución de Weibull, y cuyos parámetros pueden ser optimizados para ser escalados a su producción industrial.

Palabras clave: Paraprobióticos; bacterias ácido-lácticas; análisis de supervivencia; respuesta térmica.

Abstract

The assessment of the beneficial properties of non-viable probiotic microorganisms (paraprobiotics) is a growing topic in both food industry and human health, due to their promising prospects both at an industrial and at a clinical level. To obtain non-viable microorganisms retaining said properties, it is paramount to determine the inactivation conditions that allow for an optimization of this process. In this study we evaluated the inactivation process via thermal treatment of two strains of *Lactobacillus rhamnosus* y *L. acidophilus* cultured in fermenting conditions. At 75 °C, both probiotic strains could be completely inactivated within short time periods (8-10 min), fitting a Weibull distribution model, and whose parameters may be suitable for optimization upon escalation to industrial production of the non-viable microorganisms.

Keywords: Paraprobiotics, lactic acid bacteria; survival analysis; heat response.

1. INTRODUCCIÓN

Se define a los probióticos como microorganismos vivos que proporcionan un beneficio en la salud de aquel que los ingiere cuando son administrados en las cantidades adecuadas. De entre los microorganismos con propiedades probióticas más estudiadas destacan las bacterias ácido-

lácticas, y más concretamente las pertenecientes al género *Lactobacillus* spp. (1). Los mecanismos con los que los probióticos interactúan con la flora intestinal, si bien se han descrito ampliamente, siguen sin estar completamente dilucidados(2), y pueden incluso no requerir de viabilidad. En consecuencia, un enfoque de estudio se centra en los paraprobióticos, que se definen como células microbianas no viables, intactas o lisadas, que cuando son administradas en cantidades adecuadas contribuyen a un efecto beneficioso en la salud del consumidor (3). El interés de su utilización de reside en dos importantes ventajas sobre sus homólogos vivos. Tecnológicamente son más estables y seguros en la producción industrial, ya que interactúan en menor medida con otros componentes y no requieren de condiciones muy controladas para su conservación (4). Clínicamente, suponen una alternativa más segura para su administración en personas cuyo sistema inmune se encuentre comprometido, lo que minimiza riesgos de reacciones adversas (5). Para obtener estos paraprobióticos se debe someter a los probióticos vivos a un tratamiento que los inactive pero que a la vez consiga conservar las propiedades benignas de estos (4,6), no obstante los parámetros específicos varían según la cepa probiótica y la propiedad beneficiosa, por lo que es clave optimizar los procedimientos.

Así pues, el objetivo de este estudio se centra en determinar estas condiciones de inactivación mediante tratamiento térmico de dos cepas de bacterias ácido-lácticas comerciales crecidas en condiciones de fermentación, y mediante la modelización de los datos obtenidos usando el método de distribución de Weibull (7), establecer unos parámetros que permitan optimizar estas condiciones de inactivación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Preparación de las muestras

Se emplearon cultivos liofilizados de los microorganismos probióticos *Lactocaseibacillus rhamnosus* (cepa 278 de la Colección Española de Células Tipo (CECT)), y *Lactobacillus acidophilus* (cepa DSM 24936, adquirido a un proveedor especializado (Origgio, Italia) a través de la empresa Martínez Nieto, S.A. (Cartagena, España)). Un inóculo de 0,5 g de cada uno de ellos se activó en tubos de ensayo con caldo MRS (Condalab, España) Estos tubos de ensayo fueron incubados durante 20 h en estufa a 37 °C. Cada uno de los inóculos activados fue incorporado en botellas de 1 L de leche desnatada en polvo obtenida en supermercado local (Cartagena, España), previamente reconstituida al 8% en peso en agua destilada y esterilizada mediante autoclave a 121 °C y presión de 1 bar por encima de la presión atmosférica durante 5 min. Las muestras inoculadas se incubaron durante 20 h a 37 °C en un agitador orbital (IVYMEN, Comecta, Barcelona, España) programado a 160 rpm.

2.2 Tratamiento térmico de las muestras

Se distribuyeron alícuotas de 100 mL en bolsas estériles de polietileno tipo Stomacher™ (Seward, Reino Unido) termoselladas en condiciones de esterilidad. Las bolsas se dispusieron sumergidas en un baño estático termostatizado (JP Selecta, España) a una temperatura programada. Se realizaron tratamientos térmicos a 70 °C, 75 °C y 80 °C por triplicado. Las muestras se fueron extrayendo de forma sucesiva tras un determinado periodo de tratamiento y se fueron sembrando de forma acorde en placas de MRS agar que se incubaron durante 48 h a 37 °C.

2.3 Análisis de los datos

Los datos experimentales de supervivencia fueron modelizados mediante distribución de Weibull usando para ello el complemento Excel *Solver*, de acuerdo con la ecuación (Ec.) 1 mediante regresión no lineal (7):

$$\log \frac{N}{N_0} = - \left(\frac{t}{\delta} \right)^p \quad (\text{Ec. 1})$$

donde N representa el número de células supervivientes tras un tratamiento de tiempo t , N_0 representa el recuento inicial de células vivas, δ es el tiempo de primera reducción decimal (el tiempo en que la población de células supervivientes pasa de N_0 a $N_0/10$), y p es un parámetro de la curva de supervivencia que define su concavidad o convexidad.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se muestra en las Figuras 1 y 2, podemos describir el proceso de inactivación tanto de *L. rhamnosus* como de *L. acidophilus* crecidos en condiciones de fermentación mediante una distribución de Weibull con un buen ajuste de la raíz de la desviación cuadrática media (RDCM). Así pues, a concentraciones iniciales de 8 log UFC/mL ambos requieren de periodos cortos de inactivación a 70 °C, siendo estos inferiores a los 12 min para *L. rhamnosus* ($\delta_{70}=3.013$ min) y a 18 min para *L. acidophilus* ($\delta_{70}=8.119$).

El aumento de temperatura disminuye el tiempo de inactivación necesario para conseguir la inactivación completa de ambos microorganismos. Observamos que el efecto del aumento de temperatura en el tratamiento es significativamente mayor para *L. acidophilus* en comparación con *L. rhamnosus* (Tabla 1). De hecho, el tratamiento térmico de *L. acidophilus* a 80 °C presentó una notable alteración en la integridad del medio de fermentación empleado, lo cual puede tener un impacto negativo sobre el proceso de inactivación, por lo que estos resultados fueron descartados; no así para *L. rhamnosus* crecido y tratado en iguales condiciones.

Estos valores están en consonancia con lo descrito en la literatura para estos lactobacilos en los que la inactivación constituye metodología de trabajo para posteriores estudios. En concreto, Toki *et al.* (8) describieron la inactivación completa de *L. rhamnosus* GG tras 20 min a 70 °C, mientras que Ding *et al.* (9) reportaron este hecho para *L. acidophilus* ATCC 4356 tras 30 min a 65 °C. No obstante, destacamos que en la literatura estos tratamientos fueron realizados sobre microorganismos crecidos medios de cultivo selectivos como MRS en lugar de en leche.

4. CONCLUSIONES

En función de los resultados obtenidos, podemos concluir que el procedimiento de inactivación de los lactobacilos seleccionados puede llevarse a cabo en periodos cortos de tiempo a temperaturas en torno a los 75 °C sin que se produzca alteración sobre el medio de crecimiento, e inferir que el proceso se ajusta al método de distribución de Weibull. No obstante, los resultados aquí presentes obtenidos a escala de laboratorio deben ser validados mediante pruebas más exhaustivas y con volúmenes más cercanos a los utilizados en las producciones industriales para tratar de optimizar este procedimiento.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la empresa Martínez Nieto, S.A. su apoyo y financiación a través del Proyecto CDTI IDI-20211211, donde se enmarcan estas investigaciones.

6. REFERENCIAS

1. Goldstein EJC, Tyrrell KL, Citron DM. Lactobacillus species: Taxonomic complexity and controversial susceptibilities. Clin Infect Dis. 2015;60(Suppl 2):S98-107.
2. Cunningham M, Azcarate-Peril MA, Barnard A, Benoit V, Grimaldi R, Guyonnet D, et al. Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics. Trends Microbiol [Internet]. 2021;29(8):667-85.
3. Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: Proposal of paraprobiotic concept). Genes Nutr. 2011;6(3):261-74.
4. Barros CP, Guimarães JT, Esmerino EA, Duarte MCK, Silva MC, Silva R, et al. Paraprobiotics and postbiotics: concepts and potential applications in dairy products. Curr Opin Food Sci. 2020;32:1-8.
5. Oggioni MR, Pozzi G, Galieni P, Valensin PE, Bigazzi C. Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of Bacillus subtilis [2]. J Clin Microbiol. 1998;36(1):325-6.
6. de Almada CN, Almada CN, Martinez RCR, Sant'Ana AS. Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify

biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. Trends Food Sci Technol [Internet]. 2016;58:96–114.

7. Mafart P, Couvert O, Gaillard S, Leguerinel I. On calculating sterility in thermal preservation methods : Application of the Weibull frequency distribution model. Acta Hort. 2001;566:107–14.
8. Toki S, Kagaya S, Shinohara M, Wakiguchi H, Matsumoto T, Takahata Y, et al. Lactobacillus rhamnosus GG and Lactobacillus casei suppress Escherichia coli-induced chemokine expression in intestinal epithelial cells. Int Arch Allergy Immunol. 2008;148(1):45–58.
9. Ding Q, Sun X, Cao S, Zhao C, Wang Y, Wang X. Heat-killed Lactobacillus acidophilus mediates Fusobacterium nucleatum induced pro-inflammatory responses in epithelial cells. FEMS Microbiol Lett. 2021;368(5):1–8.

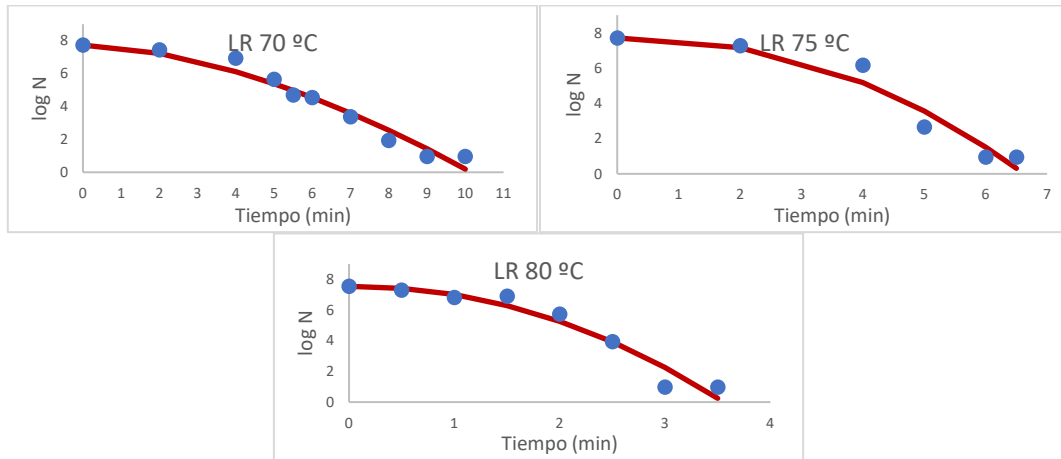


Figura 1. Inactivación térmica de *L. rhamnosus* CECT 278 a 70, 75 y 80 °C. Los puntos azules representan los datos experimentales, mientras que las líneas rojas expresan los modelos de inactivación mediante distribución de Weibull. N = Unidades Formadoras de Colonias/mL.

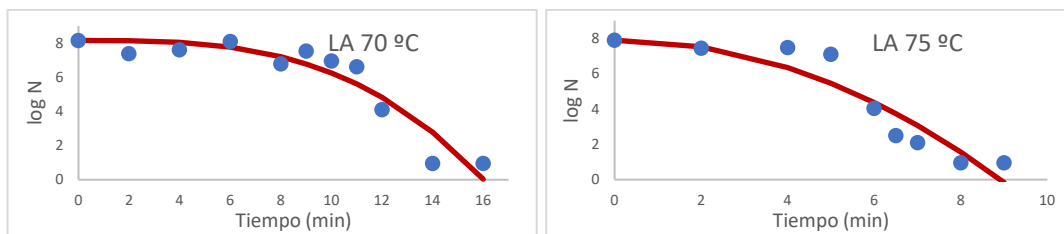


Figura 2. Inactivación térmica de *L. acidophilus* DSM 24936 a 70 y 75 °C. Los puntos azules representan los datos experimentales, mientras que las líneas rojas expresan los modelos de inactivación mediante distribución de Weibull. N = Unidades Formadoras de Colonias/mL.

Tabla 1. Valores estimados del modelo de distribución de Weibull para *L. rhamnosus* CECT 278 y *L. acidophilus* DSM 24936, obtenidos mediante inactivación térmica.

Cepa	Temperatura (°C)	Valor δ (min)	log valor δ	p	RDCM	Valor z (°C)
<i>L. rhamnosus</i> CECT 278	70	3.013	0.479	1.684	0.455	28.61
	75	2.632	0.420	2.213	0.652	
	80	1.347	0.129	2.081	0.591	
<i>L. acidophilus</i> DSM 24936	70	8.119	0.910	3.087	0.843	12.47
	75	3.226	0.509	2.034	0.955	

Evaluación de una política de internalización de las emisiones de carbono sobre la estructura de cultivos del Campo de Cartagena

Policy assessment of carbon emissions internalization on the crop structure of Campo de Cartagena

V. Martínez-García^{1*}, J.M. Martínez-Paz², F. Alcón¹

¹Departamento de Economía de la Empresa. Universidad Politécnica de Cartagena. Calle Real, Nº3, 30201, Cartagena, Murcia, España.

²Departamento de Economía Aplicada, Universidad de Murcia. Calle Campus Universitario, Edificio 2, 30100, Murcia, España.

*victor.martinez@upct.es

Resumen

La protección del medio ambiente y la mitigación de externalidades negativas en la agricultura son aspectos que han ganado protagonismo en el diseño de las políticas agrarias en las últimas décadas. El impacto de estas políticas es frecuentemente analizado en la literatura científica mediante programación matemática, técnica que simula el comportamiento de los agricultores de una zona de estudio, bajo la premisa de la racionalidad económica de sus decisiones. El objetivo de este trabajo es evaluar el impacto de una política de internalización del coste de las emisiones de carbono de la actividad agrícola sobre la estructura de cultivos del Campo de Cartagena (Región de Murcia). Para ello se emplea de manera conjunta el Análisis del Ciclo de Vida para la cuantificación de la huella de carbono y la Programación Matemática Econométrica para la modelización del escenario de implementación de la política.

Palabras clave: Programación matemática econométrica; Campo de Cartagena; análisis de ciclo de vida; huella de carbono.

Abstract

Environmental protection and the mitigation of negative externalities in agriculture are aspects that have gained prominence in the design of agricultural policies in recent decades. The impact of these policies is frequently analysed in the scientific literature by means of mathematical programming, a technique that simulates the behaviour of farmers in a study area, under the premise of the economic rationality of their decisions. The aim of this work is to evaluate the impact of a policy of internalising the cost of carbon emissions from agricultural activity on the crop structure of Campo de Cartagena (Region de Murcia). To this end, Life Cycle Analysis is used jointly to quantify the carbon footprint and Econometric Mathematical Programming to model the policy implementation scenario.

Keywords: Econometric mathematical programming; Campo de Cartagena; life cycle analysis; carbon footprint; carbon footprint.

1. INTRODUCCIÓN

Los aspectos ambientales de la producción han cobrado protagonismo en las políticas agrarias desde la década de 1990, enfatizándose los aspectos multifuncionales de la agricultura,

así como sus externalidades (tanto positivas como negativas), para las cuales no existe un mercado (1). La internalización de estas externalidades es una herramienta de política ambiental que busca corregir este fallo de mercado, haciendo coincidir el nivel óptimo social de las actividades económicas con el de los intereses privados (2).

El análisis del impacto de estas políticas ha sido realizado mayoritariamente mediante modelos de programación matemática, calibrados en su mayoría mediante el método de Programación Matemática Positiva (PMP) (3). Sin embargo, dicho método no se encuentra carente de limitaciones para su aplicación, ya que se realiza el proceso de calibración mediante ecuaciones con 0 grados de libertad y empleando únicamente los niveles de actividad observados en un único año de referencia. Estos aspectos son de especial relevancia para el caso de políticas agrarias y ambientales, dado el enfoque multifuncional que estas hacen de la agricultura y sus impactos directos sobre los costes o ingresos. Recientemente se han propuesto metodologías como la Programación Matemática Econométrica (PME) (1) que además de superar gran parte de las limitaciones econométricas de la PMP. La PME permite emplear métodos de calibración más flexibles que resultan más adecuados, ya que, además de los niveles de actividad observados, emplea información relativa a los costes de los recursos variables y limitantes. Por tanto, se adecúa más al análisis de un número de escenarios elevado.

En este contexto, el objetivo de este trabajo es evaluar el impacto económico de una política de internalización del coste de las emisiones de carbono sobre la estructura de cultivos. Para ello se utilizará como caso de estudio la agricultura de regadío del Campo de Cartagena (Región de Murcia). Se emplea el análisis de ciclo de vida (ACV) para la cuantificación de los impactos ambientales y la PME para la modelización del escenario de implementación de la política.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Determinación del caso de estudio y los principales cultivos

Se va a estudiar la agricultura de regadío del Campo de Cartagena, más concretamente, la Unidad de Demanda Agraria (UDA) 58 "*Regadíos redotados del TTS de la ZRT Campo de Cartagena*". La superficie de los principales cultivos de dicha UDA se ha determinado a partir de los datos de extensión de cada cultivo por municipio, ajustándose estos a dicha UDA mediante un proceso de desagregación dasimétrica empleando la cartografía SIGPAC como información auxiliar. Se han identificado 13 cultivos que suponen más del 88% de las 10.880 ha de superficie de regadío de la UDA. Además, también se han considerado las principales rotaciones (combinaciones) de cultivos hortícolas que se practican en la zona.

2.2 Coeficientes técnicos, costes de producción e ingresos

Los coeficientes técnicos y costes de producción, así como productividad de los distintos cultivos han sido obtenidos de distintas publicaciones del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (4-6). Con el fin de obtener datos homogéneos se ha considerado que en todos los cultivos se realizan prácticas de manejo convencionales. Los costes han sido valorados en un el año de referencia común, 2015. El coste del agua de riego por año proviene de los informes de la Comunidad de Regantes del Campo de Cartagena (7).

2.3 ACV y modelo PME

La cuantificación de las emisiones de carbono se ha realizado mediante la metodología del ACV, empleando el software Simapro 9.13 y aplicando el método IPCC 2013. El coste económico asociado a dichas emisiones de carbono se ha obtenido de una revisión de literatura (8) que ha sido actualizado temporalmente y adaptado territorialmente (9).

La calibración del modelo PME se ha realizado siguiendo la metodología propuesta por de Frahan (3) y empleando los datos de extensión de cada cultivo en la UDA para los años 2013, 2016,

2020 y 2021, así como los costes de producción estimados en cada año. El año planteado para estimar el impacto de la política es el 2021, el más reciente para el cual se dispone de datos de calibración. Así se han realizado dos modelos de PME para el año 2021, uno que reproduce la superficie de cada tipo de cultivo para dicho año en la situación actual, *status quo*, y otro mediante el cual se estiman los cambios en la estructura de cultivos en el caso de haber introducido una política de pagos por las emisiones de carbono.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos del coste económico de las emisiones de CO₂ para cada tipo de cultivo, así como la superficie ocupada por estos en 2021 y la estimada por el modelo *status quo* (modelo 1) y el de implementación de la política de pagos por las emisiones de carbono (modelo 2) se muestran en la Tabla 1.

En términos generales, el modelo 1 reproduce de forma precisa la estructura de cultivos estimada para el año 2021 en la situación *status quo*, aunque conviene matizar que en este se infraestima ligeramente la superficie de los cultivos hortícolas en pro de los leñosos. Además, en los resultados del modelo se incluyen rotaciones de cultivos hortícolas no existentes en el año objetivo, pero si observadas en los años de calibración, lo cual lleva a ligeras sobrestimaciones de estos cultivos, como es el caso de la patata.

La implementación de una política de internalización del coste de las emisiones de carbono supondría una reducción de la superficie de regadío de 820.8 ha (Tabla 1, Modelo 2). Esta reducción sería prácticamente generalizada en todos los cultivos, pero no homogénea, siendo más acusada en el olivar de regadío, el viñedo y la alcachofa. Por el contrario, el pimiento en invernadero sería el único cultivo que no reduciría su superficie de cultivo. Estas diferencias parecen explicarse por la diferencia entre los márgenes brutos asociados a cada cultivo y el coste de las emisiones de CO₂, siendo los cultivos que más reducirían su superficie aquellos con menor diferencia entre su margen bruto y el pago por las emisiones.

El diseño de las políticas agroambientales debe tener en cuenta el carácter multifuncional de la agricultura. Por tanto, la inclusión de otras externalidades negativas de la actividad agrícola, así como de las externalidades positivas, en forma de servicios agro-ecosistémicos (10), podría tener un impacto muy distinto sobre la estructura de cultivos.

4. CONCLUSIONES

La PME se ha mostrado como una herramienta válida para modelizar el impacto de políticas agrarias que abordan el carácter multifuncional de la agricultura. No obstante, la calibración de este tipo de modelos requiere de mucha información con elevado grado de detalle, la cual determinante para un buen funcionamiento de la técnica.

La implementación de una política de internalización del coste de las emisiones de carbono de las producciones agrarias en el Campo de Cartagena originaría una reducción de la superficie de regadío en cultivo, la cual no sería homogénea entre los diferentes cultivos. Así esta reducción afectaría principalmente a aquellos cultivos con menor diferencia entre el margen bruto y el pago por las emisiones de CO₂.

5. AGRADECIMIENTOS

Proyecto PID2020-114576RB-I00 financiado por MCIN/ AEI /10.13039/501100011033. Victor Martínez-García agradece la financiación recibida por el Ministerio de Educación y Formación Profesional (FPU19/05143).

6. REFERENCIAS

1. Buysse J, Van Huylenbroeck G, Lauwers L. Normative, positive and econometric mathematical programming

- as tools for incorporation of multifunctionality in agricultural policy modelling. *Agric Ecosyst Environ* [Internet]. 2007 Apr 1 [cited 2023 Apr 9];120(1):70–81. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167880906003902>
2. Folkens L, Wiedemer V, Schneider P. Monetary valuation and internalization of externalities in German agriculture using the example of nitrate pollution: A case-study. *Sustain*. 2020 Aug 1;12(16).
 3. Henry de Frahan B. Towards Econometric Mathematical Programming for Policy Analysis. In: *Natural Resource Management and Policy*. Springer; 2019. p. 11–36.
 4. García García J. Estructura de costes de las orientaciones productivas agrícolas de la Región de Murcia: horticultura al aire libre y bajo invernadero. Murcia: Comunidad Autónoma de la Región de Murcia; 2018. 1–138 p.
 5. García García J. Estructura de costes de las orientaciones productivas agrícolas de la Región de Murcia: Frutales de hueso y cítricos. Comunidad Autónoma de la Región de Murcia; 2018. 1–138 p.
 6. García García J. Estructura de costes de las orientaciones productivas agrícolas de la Región de Murcia: Frutos secos, frutales de pepita, vid y olivo. Murcia: Comunidad Autónoma de la Región de Murcia; 2019. 1–128 p.
 7. Comunidad de Regantes del Campo de Cartagena [Internet]. 2023 [cited 2023 Apr 14]. Available from: <https://www.crcc.es/>
 8. De Bruyn S, Bijleveld M, de Graaff L, Schep E, Schrotten A, Vergeer R, et al. *Environmental Prices Handbook*. Committed to Environ Delft [Internet]. 2018;18.7N54.12:176. Available from: <https://cedelft.eu/publications/environmental-prices-handbook-eu28-version/>
 9. González XM, Rodríguez M, Pena-Boquete Y. The social benefits of WEEE re-use schemes. A cost benefit analysis for PCs in Spain. *Waste Manag*. 2017;64:202–13.
 10. Zabala JA, Martínez JM, Alcon F. A comprehensive approach for agroecosystem services and disservices valuation. *Sci Total Environ*. 2021;768.

Tabla 1. Coste de las emisiones de carbono por cultivo, superficie observada en 2021 y superficie estimada por el modelo en la situación *status quo* (Modelo 1) y con la implementación de la política del pago por emisiones de CO₂ (modelo 2).

Cultivo	Coste de las emisiones de CO ₂ (€/ha)	Superficie observada en 2021 (ha)	Modelo 1 (ha)	Modelo 2 (ha)
Alcachofa	799	887	609	526
Almendra en regadío	285	91	90	85
Limonero	451	2.849	2.623	2.527
Mandarino	511	1.237	1.182	1.132
Naranja	511	1.405	1.817	1.721
Olivar en regadío	289	94	109	94
Pimiento en invernadero	209	809	688	686
Pomelo	499	231	150	137
Lechuga y melón	792	1.689	1.414	1.352
Apio y patata	995	571	333	314
Brócoli y patata	830	1.017	1.041	989
Patata repetición	829	0,0	171	165

Influencia de la pasteurización en el perfil fitoquímico de nuevas bebidas a base de maqui, con diferentes edulcorantes adicionados, durante la producción y conservación

Influence of pasteurization in the phytochemical profile of new maqui berry- based beverages, with different sweeteners added, during production and storage

F.J. Salar^{1*}, P.M. Periago ², P.S. Fernández ², C. García-Viguera ¹

¹Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables (LabFAS). Departamento Ciencia y Tecnología de Alimentos, (CEBAS-CSIC), Campus de Espinardo, Edif. 25, 30100 Murcia, España.

²Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

*fjsalar@cebas.csic.es

Resumen

En las últimas décadas, el consumo de bebidas azucaradas se ha asociado con un mayor riesgo de enfermedades crónicas. Consecuentemente, las industrias alimentarias están desarrollando nuevas formulaciones con bajo contenido de azúcar y alto contenido en compuestos bioactivos. Así, este trabajo tiene como objetivo desarrollar nuevas bebidas funcionales, que constituyan una fuente dietética de compuestos fenólicos suplementadas con estevia, sucralosa o sacarosa, con el fin de estudiar la influencia del edulcorante durante su procesamiento y almacenamiento. El impacto de las tecnologías de procesamiento sobre el perfil fitoquímico y microbiológico se evaluó aplicando dos tratamientos térmicos a 60 y 80 °C durante 15 s. Se monitorizó el almacenamiento a 5 y 25 °C durante 60 días. Ambos tratamientos de pasteurización aseguraron la estabilidad microbiológica a lo largo de la vida útil. Además, el perfil fisicoquímico no mostró diferencias significativas entre las bebidas durante el período de almacenamiento de 60 días.

Palabras clave: Antociano; tratamiento térmico; estevia.

Abstract

In recent decades, the consumption of sugary drinks has been associated with an increased risk of chronic diseases. Consequently, food industries are developing new formulations of beverages with low sugar and high bioactive compound contents. In this regard, this work aims to develop new functional beverages, which constitute a dietary source of phenolic compounds and supplemented with stevia, sucralose or sucrose, in order to study the influence of the sweetener during processing and storage. The impact of the processing technologies on phytochemical and the microbiological profile was evaluated by applying two heat treatments at 60 and 80 °C for 15 s. The storage at 5 and 25 °C was monitored for 60 days. Both pasteurization treatments ensured microbiological stability throughout shelf life. Moreover, the physicochemical profile did not display significant differences between beverages over a 60-day storage period.

Keywords: Anthocyanin; heat treatment; stevia.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte humana, y una proporción importante de las ECV son consecuencia de hábitos alimentarios inadecuados que influyen en otras condiciones fisiopatológicas (obesidad, hipertensión, diabetes mellitus, colesterol alto, entre otras) estrechamente relacionadas con la incidencia de las ECV(1). Así, estudios epidemiológicos previos han demostrado que el consumo de bebidas azucaradas es uno de los principales factores que contribuyen a la incidencia de las ECV y las comorbilidades (2).

En este sentido, las industrias de alimentos y bebidas están desarrollando productos con menor contenido de azúcares (sacarosa o fructosa), enfocando su actividad en el desarrollo de nuevas formulaciones, que ayuden a preservar los nutrientes y reduzcan el contenido glucémico de las bebidas, para lo cual basan su estrategia en la adición de otros edulcorantes no calóricos, como es el caso de la estevia (3).

Para desarrollar nuevos alimentos y bebidas saludables utilizando edulcorantes no calóricos, se seleccionan frutas con un alto contenido de compuestos biodisponibles y bioactivos como frutas rojas (bayas), siendo el maqui (*Aristotelia chilensis (Mol.) Stunz*), un ingrediente alimentario de especial relevancia, como potencial fuente rica en antocianos (delfinidinas y cianidinas) (4). De hecho, la caracterización nutricional y fitoquímica de esta fruta, así como sus propiedades biológicas, han sugerido la capacidad de las antocianinas del maqui para modular la hiperglucemia y la sensibilidad a la insulina, así como para inhibir los mecanismos involucrados en la absorción de azúcares (5).

Por otra parte, en cuanto al proceso de elaboración de las bebidas, la pasteurización es una tecnología de procesado muy utilizada, entre otros tratamientos térmicos, ya que inactiva microorganismos y enzimas, asegurando la estabilidad a lo largo del proceso de fabricación y la vida útil, pero su influencia en los compuestos bioactivos (específicamente los más lábiles) debe estudiarse cuidadosamente para cada nueva bebida.

Dados estos antecedentes, el propósito del presente estudio fue evaluar la influencia con respecto al perfil microbiológico y fitoquímico, de los diversos edulcorantes (estevia, sucralosa y sacarosa) adicionados en la elaboración de las nuevas bebidas, ricas en compuestos bioactivos (especialmente antocianos), durante el procesado y vida útil de las bebidas de frutas, almacenándolas durante 60 días a 5 y 25 °C.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Compuestos químicos y reactivos

El metanol y ácido fórmico 98% fueron obtenidos de PanReac (Barcelona, España). El estándar de cianidina 3-*O*-glucosido ($\geq 98\%$ pureza) se adquirió de TRansMIT. El Plate Count Agar (PCA) y el Agar Rosa de Bengala fueron obtenidos de Scharlab (Barcelona, España). Todas las soluciones se prepararon con agua ultrapura de un sistema de purificación de agua ultrapura Milli-Q Advantage A10 (Millipore, EE. UU.).

2.2 Ingredientes

El maqui orgánico seco y en polvo fue proporcionado por Maqui New Life S.A. (Santiago, Chile). Los edulcorantes sacarosa, estevia y sucralosa fueron proporcionados por AB Azucarera Iberia S.L. (Madrid, Spain), Agriestevia S.L (Murcia, Spain), y Sunvision Sweet Co., Ltd. (Xintai City, China), respectivamente. Las bebidas cítricas fueron adquiridas de las empresas Cítricos de Murcia S.L. (Murcia, España) y AMC Grupo Alimentación S.A. (Murcia, España).

2.3 Diseño experimental

Los zumos de cítricos fueron mezclados con el maqui en polvo para obtener las bebidas de base. Posteriormente, estas bebidas fueron suplementadas con los tres edulcorantes. Finalmente, fueron procesadas con dos tratamientos térmicos de pasteurización a 60 y 80 °C durante 15 s.

Las bebidas se almacenaron inmediatamente después del procesamiento a 5 y 25 °C en oscuridad durante 60 días. Las muestras se analizaron a los 0, 15, 30, 45 y 60 días. Todas las determinaciones analíticas fueron llevadas a cabo por triplicado.

2.4 Análisis microbiológico

Las muestras se diluyeron asépticamente en agua de peptona tamponada y luego se analizaron para cuantificar las bacterias aerobias mesófilas y psicrófilas, mohos y levaduras. Las cuantificaciones de mohos y levaduras se realizaron sembrando las muestras en Agar Rosa de Bengala (RBA), seguido de incubación durante 5 días a 25 °C. Los recuentos de bacterias aerobias mesófilas y psicrófilas se realizaron en medio Plate Count Agar (PCA), incubados durante 48 h a 30 °C y durante 10 días a 5 °C, respectivamente. Los recuentos microbianos se expresaron como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

2.5 Identificación y cuantificación de antocianos

La identificación y cuantificación de compuestos fenólicos se realizó aplicando el método previamente reportado por Salar et al. (6) mediante HPLC-DAD. Los compuestos fenólicos de las muestras se identificaron por comparación con compuestos estándar de grado analítico. Los antocianos se cuantificaron como cianidina 3-*O*-glucósido a 520 nm. Los resultados se expresaron como contenido total de antocianos en mg por 100 mL de bebida.

2.6 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm SD ($n = 3$). Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de rango múltiple de Tukey para comparar tres o más condiciones. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS 19.0 (LEAD Technologies, Inc., Chicago, IL, EE. UU.). El nivel de significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los antocianos individuales (cianidinas y delfinidinas) presentes en *A. chilensis*, descritos previamente por Salar et al. (6), se identificaron y cuantificaron por HPLC-DAD. La concentración total inicial de antocianos fue similar para los distintos zumos ($p > 0.05$), 19.15 ± 0.12 mg/ 100 mL en los zumos edulcorados con sucralosa, 19.69 ± 0.08 mg/ 100 mL en los zumos suplementados con estevia, y 19.55 ± 0.11 mg/ 100 mL para los zumos con sacarosa.

Durante el almacenamiento se observó una disminución general de los compuestos fenólicos (antocianos), llegando a perder alrededor del 50% a los 2 meses para todos los edulcorantes, cuando se almacenaron a 5 °C, independientemente de las condiciones de pasteurización (Fig. 1 y Fig. 2). Para aquellas muestras almacenadas a 25 °C, estos porcentajes se alcanzaron después de solo 15 días, con una tasa de degradación final del 100% a los 60 días, independientemente del edulcorante adicionado ($p > 0.05$). Por tanto, estos resultados confirmaron que la tasa de degradación de antocianos en las bebidas de frutas, es menor cuanto más baja sea la temperatura de almacenamiento (7).

En cuanto al análisis microbiológico, tanto para los microorganismos mesófilos totales como para los psicrófilos, los resultados fueron <10 UFC/mL, para todas las bebidas, a 5 °C y almacenamiento a 25 °C, independientemente del edulcorante agregado (datos no mostrados). Para mohos y levaduras, los resultados fueron <100 UFC/mL para todas las condiciones y edulcorantes (datos no mostrados) después de 60 días de almacenamiento.

4. CONCLUSIONES

La temperatura de almacenamiento tiene el mayor efecto en la conservación de los antocianos, mientras que el tipo de edulcorante no influye, ni en la conservación de los antocianos (solo con ligeras diferencias en la cinética de degradación de los antocianos entre los edulcorantes) ni en el perfil microbiológico final. Por otro lado, la pasteurización tiene poca influencia en la concentración de compuestos bioactivos. Así, los resultados obtenidos indican que tanto estevia como la sucralosa podrían ser considerados como edulcorantes alternativos por la industria alimentaria, en cuanto al uso de sacarosa, contribuyendo de esta manera a la reducción de la ingesta de azúcares.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el MICINN español a través del Proyecto de Investigación PID2019-104212RB-I00/AEI/10.13039/501100011033. F.J.S es apoyado por una beca FPU del programa de becas del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades de España (MICIU).

6. REFERENCIAS

1. Peng J, Xiao X, Hu M, Zhang X. Interaction between gut microbiome and cardiovascular disease. *Life Sci.* 2018;214(August):153–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.10.063>
2. Popkin BM. Sugary beverages represent a threat to global health. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(12):591–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2012.07.003>
3. Carrera-Lanestosa A, Moguel-Ordóñez Y, Segura-Campos M. Stevia rebaudiana Bertoni: A Natural Alternative for Treating Diseases Associated with Metabolic Syndrome. *J Med Food.* 2017;20(10):933–43.
4. Araos JP. *Aristolelia chilensis*: A Possible Nutraceutical or Functional Food. *Med Chem (Los Angeles).* 2015;5:378–82.
5. Rubilar M, Jara C, Poo Y, Acevedo F, Gutierrez C, Sineiro J, et al. Extracts of maqui (*Aristolelia chilensis*) and murta (*Ugni molinae* Turcz.): Sources of antioxidant compounds and α -glucosidase/ α -amylase inhibitors. *J Agric Food Chem.* 2011;59(5):1630–7.
6. Salar FJ, Agulló V, García-Viguera C, Domínguez-Perles R. Stevia vs. Sucrose: Influence on the Phytochemical Content of a Citrus–Maqui Beverage—A Shelf Life Study. *Foods.* 2020;9(2):219.
7. Muche BM, Speers RA, Rupasinghe HPV. Storage Temperature Impacts on Anthocyanins Degradation, Color Changes and Haze Development in Juice of “Merlot” and “Ruby” Grapes (*Vitis vinifera*). *Front Nutr.* 2018;5:1–9.

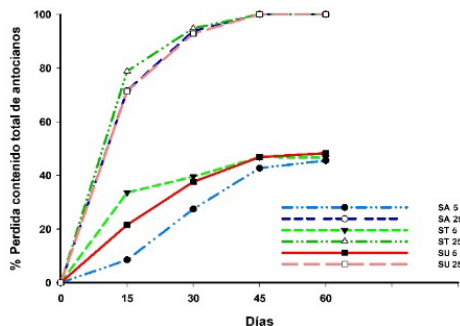


Fig. 1. Porcentaje de pérdida del contenido total de antocianos durante 60 días de almacenamiento con tratamiento de pasteurización a 60 °C. SA 5 (sacarosa), ST 5 (estevia) y SU 5 (sucralosa), con almacenamiento a 5 °C. SA 25 (sacarosa), ST 25 (estevia) y SU 25 (sucralosa), con almacenamiento a 25 °C.

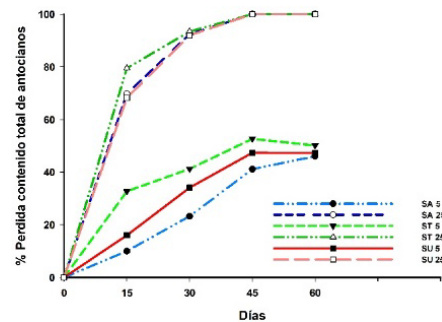


Fig. 2. Porcentaje de pérdida del contenido total de antocianos durante 60 días de almacenamiento con tratamiento de pasteurización a 80 °C. SA 5 (sacarosa), ST 5 (estevia) y SU 5 (sucralosa), con almacenamiento a 5 °C. SA 25 (sacarosa), ST 25 (estevia) y SU 25 (sucralosa), con almacenamiento a 25 °C.

SESIÓN ORAL:
Tecnología e Ingeniería
de la Producción
Vegetal

Ácaros astigmátidos como alimento suplementario para razas mejoradas de *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae)

Astigmatid mites as supplementary food for improved strains of *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae)

A. Rodríguez-Gómez*, A. Donate, V. Balanza, M.C. Reche, A.B. Abelaira, I. Sánchez-Martínez, P. Bielza

Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso, XIII, 48. 30203 Cartagena, Murcia, España.

*amador.rg90mail.com

Resumen

La presencia continua de agentes de control biológico es fundamental en el éxito del control biológico, siendo *Orius laevigatus* uno de los depredadores más utilizados. Su éxito es gracias a su capacidad de alimentarse de otros alimentos alternativos como el polen. Pero existen cultivos carentes de polen por lo que se recurre a alimentos suplementarios. Una posibilidad son los ácaros astigmátidos, utilizados con éxito en la producción de ácaros depredadores, pero no para los insectos depredadores. Hemos estudiado la alimentación con estos ácaros presa en varias poblaciones de *O. laevigatus*, una comercial y otras seleccionadas para una mejor respuesta alimentándose de polen. Las razas seleccionadas presentaron mejor supervivencia durante el desarrollo ninfal y mayor fecundidad cuando se alimentan de ácaros astigmátidos. Por lo tanto, estos ácaros astigmátidos podrían usarse como un alimento suplementario rentable sobre los cultivos para mejorar la instalación y supervivencia de nuestras razas mejoradas.

Palabras clave: Agentes de control biológico; control biológico; alimento alternativo; supervivencia; fecundidad.

Abstract

The continuous presence of biological control agents is fundamental in the success of biological control, being *Orius laevigatus* one of the most used predators. Its success is thanks to its ability to feed on other alternative foods such as pollen. But there are crops devoid of pollen, so supplementary foods are used. One possibility is astigmatid mites, used successfully in the production of predatory mites, but not for predatory insects. We have studied feeding with these prey mites in various populations of *O. laevigatus*, one commercial and others selected for a better response feeding on pollen. The selected strains presented better survival during nymphal development and higher fecundity when they feed on astigmatid mites. Therefore, these astigmatid mites could be used as a cost-effective supplementary feed on crops to improve the establishment and survival of our improved strains.

Keywords: Biological control agents; biological control; alternative food; survival; fecundity.

1. INTRODUCCIÓN

La Gestión Integrada de Plagas basada en los agentes de control biológico tiene un éxito rotundo en muchos cultivos, sobre todo en aquellos que se producen bajo invernadero (1). Este éxito es en gran medida gracias al uso de depredadores omnívoros, capaces de alimentarse de diferentes presas y en ausencia de ellas son capaces de permanecer en el cultivo gracias a su capacidad de alimentarse de otros alimentos alternativos disponibles como el polen (2). El chinche depredador *Orius laevigatus* es un claro ejemplo de depredador omnívoro, uno de los enemigos naturales más empleados en la cuenca mediterránea y el norte de Europa. Esencial en el control del trips *Frankliniella occidentalis*, también es capaz de alimentarse de polen en escasez o ausencia de presas. Gracias a ello, se puede liberar de forma preventiva antes de que aparezca la plaga (3). Sin embargo, en cultivos cuyas flores carecen de polen hace que sea imposible de hacer una buena estrategia de control preventivo. Las poblaciones seleccionadas con éxito por el grupo Biocontrol Selection Lab presentan unos valores mejorados de supervivencia y fecundidad alimentándose de polen (2). El polen es suministrado en cultivos que carecen de él, y las razas seleccionadas pueden establecerse, sin embargo, en condiciones de humedad relativa alta el polen suministrado puede degradarse con facilidad e incluso puede crear problemas de hongos en los cultivos, siendo también alimento para plagas como es el trips. Por otro lado, los ácaros astigmátidos son empleados con éxito en la alimentación de ácaros fitoseidos, se producen fácilmente de forma económica y no presenta problemas de suministro durante todo el año. Es un alimento de buena calidad para ácaros depredadores, pero no para insectos depredadores. Por esto último, planteamos la posibilidad de que las poblaciones adaptadas a un alimento subóptimo como el polen también podrían presentar una mejor respuesta de supervivencia y fecundidad alimentándose de ácaros astigmátidos que una población estándar, y por tanto poder emplear este alimento rentable directamente en el cultivo para facilitar la actuación de las razas de *O. laevigatus* seleccionadas en programas de control.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Poblaciones de *Orius laevigatus*

Los diferentes experimentos se llevaron a cabo por un lado con poblaciones comerciales (Agrobío y Biobest) y por otro lado con poblaciones seleccionadas a un alimento subóptimo (polen), obtenidas a través de un proceso de selección (2). El mantenimiento de las poblaciones empleadas se llevó a cabo mediante la metodología de cría previamente descrita (4).

2.2 Ensayos de fecundidad

Estos experimentos fueron realizados para comparar la cantidad de huevos depositados entre las hembras de las distintas poblaciones (comerciales y seleccionada) alimentadas con ácaros astigmátidos. Para este ensayo, las ninfas de quinto estadio fueron seleccionadas y dejadas durante cuatro días para obtener adultos recién emergidos. Posteriormente se sexaron 40 hembras, número de repeticiones para cada tipo de población y dieta. Cada hembra fue depositada en un vaso de plástico de 30 ml cubierto por una tapa agujereada para facilitar la ventilación. Cada vasito contenía el alimento, ácaros astigmátidos *ad libitum* y un trozo de judía de unos 3,5 cm sellada con parafina en ambos extremos como fuente de hidratación y oviposición. Cada 3-4 días se contaron los huevos, examinando cada trozo de judía con una lupa estereoscópica, cambiándolo por uno nuevo y añadiendo alimento fresco. Este proceso se repetía hasta que la hembra moría; de esta forma se medía la fecundidad a lo largo de su vida. Estos experimentos se realizaron en condiciones controladas de laboratorio de 26 ± 1 °C, 65 ± 5 % de HR y fotoperíodo de luz-oscuridad de 16:8.

2.3 Ensayos de supervivencia

Para este tipo de experimento, se empezó recolectando el mayor número de huevos recién depositados (24h), para ello, se introdujeron pequeños trozos de judía (3 cm aprox.) en los

recipientes con adultos de cada población (comercial y seleccionada) y eran cambiados por trozos nuevos cada 24 horas. Los trozos de judía que eran extraídos fueron conservados a 6°C, con el fin de evitar el desarrollo de los huevos. Este proceso fue repetido durante una semana. Pasado ese tiempo, los huevos de cada trozo de judía se contaron con una lupa binocular y cada 90-110 huevos se colocaron en vasos de cartón de 200 ml, con una pieza extra de judía de aproximadamente 5 cm, cáscara de trigo sarraceno y ácaros astigmátidos *ad libitum*. Cada vaso que contenía entre 90 y 100 huevos se consideró una repetición, con un total de cinco repeticiones para cada población y dieta (un total de 500 huevos por población). Todas las repeticiones fueron dejadas en condiciones de laboratorio, $26 \pm 1^\circ\text{C}$, $65 \pm 5\%$ HR y fotoperíodo luz-oscuridad 16:8. El cambio de judías y el suministro de alimento fresco se realizó tres veces por semana, observando siempre el estadio ninfal de los individuos. Después de 10 días, se observó cada repetición cada 24 h para retirar los adultos recién emergidos (<24 h), siguiendo este procedimiento hasta que no quedaron ninfas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la fecundidad se muestran en la Fig. 1. Ambas poblaciones comerciales presentaron valores similares para fecundidad, pero con respecto a la población seleccionada, sí que se observaron diferencias significativas ($F = 5.04$, $gl = 2/68$, $p < 0.05$), presentando una fecundidad superior.

Los resultados de supervivencia de huevo a adulto de las diferentes poblaciones alimentándose de ácaros astigmátidos se pueden observar en la Fig. 2. Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($F = 1.44$, $gl = 2/14$, $p > 0.05$), sí que se puede observar una tendencia en cuanto al porcentaje medio de supervivencia, presentando las poblaciones seleccionadas a polen el doble o el triple de supervivencia en este caso.

La fecundidad de las poblaciones de *O. laevigatus* alimentadas con un alimento óptimo como huevos de *Ephestia kuehniella* puede superar los 100 huevos por hembra (2). Sin embargo, la fecundidad cuando se alimentan con ácaros astigmátidos se reduce drásticamente a 6-5 huevos en las poblaciones comerciales, pero casi el doble en la población seleccionada. Aunque la fecundidad es reducida, esta alimentación suplementaria permitiría el mantenimiento de la población del depredador en el cultivo, siendo la respuesta de la población seleccionada superior a las comerciales.

4. CONCLUSIONES

Como conclusión podemos decir que las líneas mejoradas de *O. laevigatus* presentan una mejor respuesta reproductiva y de desarrollo cuando se alimentan de un alimento subóptimo como son los ácaros astigmátidos. Por tanto, se puede emplear este alimento rentable directamente en el cultivo para facilitar la actuación de las razas de *O. laevigatus* seleccionadas en programas de control biológico.

5. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el proyecto PID2020-116897RB-I00 financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y la Agencia Estatal de Investigación MCIN/AEI/10.13039/501100011033. El contrato de A.R.-G. fue cofinanciado por el Plan de Apoyo a la I+D+i de la Universidad Politécnica de Cartagena. El contrato de V. B. fue financiado por proyecto PDC2021-121383-I00 financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y la Agencia Estatal de Investigación MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y European Union Next Generation EU/PRTR. El contrato de A.B.A. fue cofinanciado por la ayuda 21578/FPI/21 de la Fundación Séneca (Región de Murcia) y Agrobío. El contrato de I.S.-M. fue financiado por el proyecto PLEC2021-007774 financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y la Agencia Estatal de Investigación MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y European Union Next Generation EU/PRTR.

6. REFERENCIAS

1. Van Lenteren, J.C.; Alomar, O.; Ravensberg, W.J.; Urbaneja, A. Biological Control Agents for Control of Pests in Greenhouses. In Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops; Plant Pathology in the 21st Century 9; Springer: Cham, Switzerland, 2020.
2. Mendoza, J.E.; Balanza, V.; Cifuentes, D.; Bielza, P. Genetic improvement of *Orius laevigatus* for better fitness feeding on pollen. J. Pest Sci. 2020, 94, 729–742.
3. Sánchez, J.A.; Alcázar, A.; Lacasa, A.; Llamas, A.; Bielza, P. Integrated pest management strategies in sweet pepper plastic houses in the Southeast of Spain. IOBC/WPRS Bull. 23: 21-30.
4. Rodríguez-Gómez, A.; Donate, A.; Sánchez-Martínez, I.; Balanza, V.; Abelaira, A.B.; Reche M.C.; Bielza, P. Inheritance and Biological Characterization of an Orange-nymph mutant in *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae). Insects. 2022, 13, 996.

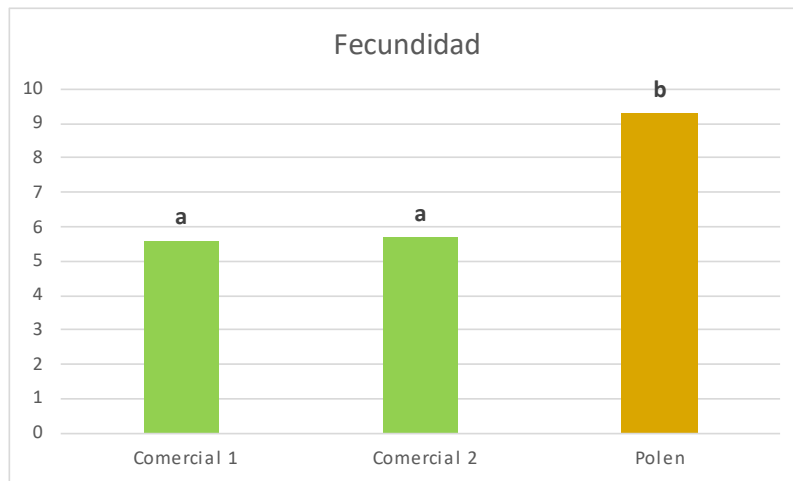


Figura 1. Fecundidad total media de cada población alimentada con ácaros astigmátidos.

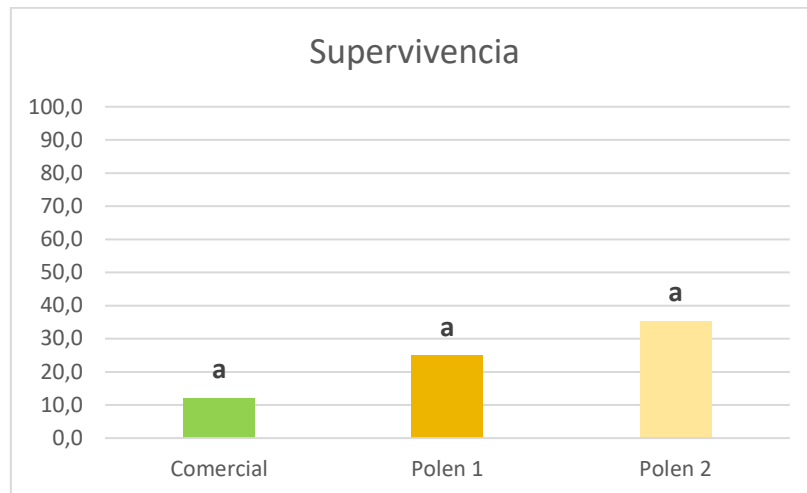


Figura 2. Porcentaje de supervivencia de huevo a adulto de cada población alimentada con ácaros astigmátidos.

Variabilidad de la fecundidad de poblaciones de *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) a bajas temperaturas

Variability of fecundity of populations of *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) at low temperatures

A.B. Abelaira*; J.E. Mendoza; I. Sánchez-Martínez; M.C. Reche; V. Balanza; A. Donate; A. Rodríguez-Gómez; P. Bielza

Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII 48. 30203 Cartagena. España.

*aniqa95_ct@hotmail.com

Resumen

Los enemigos naturales son sensibles a fluctuaciones ambientales, siendo la temperatura el factor ambiental que más influye. La fecundidad de *Orius laevigatus* disminuye a bajas temperaturas, mientras que el trips, *Frankliniella occidentalis*, es capaz de desarrollarse, generándose una falta de control en invierno. Obtener cepas tolerantes al frío posibilitaría sueltas tempranas mejorando el biocontrol en esta época. Por tanto, se estudió la variabilidad de 4 poblaciones silvestres mediterráneas y 1 comercial en su fecundidad a 15 °C, respecto de la fecundidad del control, a 26 °C. Existen diferencias significativas de la fecundidad entre las poblaciones a bajas temperaturas. Agrobío destaca en fecundidad a 26°C y Cazorla a 15°C, siendo esta última la que presenta una mayor fecundidad para ambos tratamientos respecto al resto de poblaciones silvestres. Este es el inicio de un proceso de selección para la obtención de poblaciones adaptadas al frío, mejorando el biocontrol del trips en invierno.

Palabras clave: Agentes de control biológico; control biológico; alimento alternativo; supervivencia; fecundidad.

Abstract

Natural enemies are sensitive to environmental fluctuations, with temperature being the most influential environmental factor. The fertility of *Orius laevigatus* decreases at low temperatures, while the thrips, *Frankliniella occidentalis*, is able to develop, generating a lack of control in winter. Obtaining cold-tolerant strains would allow early releases, improving biocontrol at this time. Therefore, the variability of 4 Mediterranean wild populations and 1 commercial population in their fecundity at 15 °C, compared to the fecundity of the control, at 26 °C, was studied. There are significant differences in fecundity between populations at low temperatures. Agobío stands out in fecundity at 26°C and Cazorla at 15°C, the latter being the one with the highest fecundity for both treatments compared to the rest of the wild populations. This is the beginning of a selection process to obtain populations adapted to cold, improving biocontrol of thrips in winter.

Keywords: Biological control agents; biological control; alternative food; survival; fecundity.

1. INTRODUCCIÓN

El uso de enemigos naturales es un método de control de plagas eficiente y robusto. Sin embargo, ciertos factores como la humedad y la temperatura influyen en el establecimiento de los agentes de control biológico en el cultivo. *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) es un depredador generalista muy utilizado en control biológico y es el principal enemigo de *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae), una de las plagas que mayores daños económicos provoca en cultivos de invernadero de todo el mundo. Sin embargo, la temperatura influye negativamente en la capacidad reproductiva de *O. laevigatus*, ya que para que exista elevada fecundidad en las hembras de este insecto, son necesarias temperaturas superiores a 20 °C [1]. Además, la respuesta a las condiciones ambientales es distinta entre los enemigos naturales y sus presas, afectando al establecimiento y tasa de reproducción de los mismos. Por ejemplo, el umbral de temperatura para *O. laevigatus* (alrededor de 11 °C) [2] es más alto que el de su presa *F. occidentalis* (alrededor de 8 °C) [3]. Por tanto, la plaga se desarrolla durante los meses de invierno dentro de los invernaderos, pero no el depredador, ocasionando la falta de control en los meses más fríos. Por ello, en ciertas latitudes en invierno es difícil encontrar *Orius*, aunque se haya realizado una suelta efectiva durante el otoño, ya que el frío reduce su fecundidad [4].

El mejoramiento genético de enemigos naturales podría responder a los desafíos planteados [5]. La selección artificial de enemigos naturales con ciertos rasgos puede contribuir a un mayor éxito del control biológico. Por tanto, el objetivo de este trabajo es estudiar inicialmente la variabilidad de la fecundidad de distintas poblaciones de *O. laevigatus* con el fin de realizar, más tarde, una selección para conseguir cepas mejoradas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Recolección y cría de *Orius laevigatus*.

El material biológico utilizado para la cría en laboratorio de *O. laevigatus* se obtuvo de recolecciones de diferentes poblaciones silvestres de distintos lugares de clima mediterráneo. Las poblaciones se criaron utilizando recipientes de plástico de 1 L con tapas de papel de filtro, huevos congelados de *Ephestia kuehniella* (en adelante, huevos de *Ephestia*) *ad libitum* como alimento, trozos de judía como fuente de humedad y sustrato de desove y cáscara de trigo sarraceno como refugio para evitar canibalismo. Todas estas poblaciones se mantuvieron en condiciones controladas a 26±1°C, 65±5% rh y condiciones de luz L16:D8.

Las poblaciones empleadas para el estudio de la fecundidad fueron Teruel, Logroño, Mérida, Cazorla y una población comercial conocida como Agrobío.

2.2 Método de evaluación de fecundidad.

Se partió de ninfas de último estadio de cada población silvestre y comercial, que fueron introducidas en distintos recipientes diferenciados por población con las mismas condiciones que en la cría. Tras un tiempo durante el cual emergen los adultos y se realiza la cópula, se individualizan hembras para someterlas a un tratamiento de temperatura de 26°C como control y otras a 15°C como tratamiento diferencial de cada población, para estudiar la diferencia de fecundidad entre ambos tratamientos y entre las respectivas poblaciones. En pequeños recipientes de polipropileno de 45 mL con tapa ajustable se proporciona a cada hembra un trozo de judía como sustrato de puesta e hidratación, así como huevos de *Ephestia* como alimento. Todos los bioensayos realizaron con fotoperiodo 16:8 (Luz: Oscuridad).

2.3 Lectura y toma de datos

Cada 2-3 días se cambió la judía a las hembras aisladas a 26°C durante 10 días y semanalmente a las hembras a 15°C durante 15 días, anotando el número de huevos puestos durante ese tiempo.

2.4 Análisis estadístico

Para comprobar si existían diferencias significativas entre la fecundidad de las distintas poblaciones sometidas a tratamientos de 15°C y 26°C, se realizó un ANOVA, además de un test de correlación para evaluar la interacción entre los tratamientos. Todos los test se evaluaron al 95% de confianza ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza prueba que los factores población y temperatura tienen una interacción estadísticamente significativa sobre la fecundidad ($F=25,35$; $g.l.=4/426$; $P=0,000$). En el análisis de correlación no se observó relación alguna entre la fecundidad diaria media (FDM) de los tratamientos ensayados.

Todas las poblaciones de *O. laevigatus* fueron capaces de ovipositar independientemente de la temperatura. Sin embargo, en la Tabla 1 podemos observar los resultados para las dos variables de FDM evaluadas a 15°C y a 26°C en función de la población, observándose una clara reducción de la FDM a 15°C como ocurre en el estudio de [1] donde el número total de huevos ovipositados por *O. laevigatus* a 30 °C es dos veces mayor, y el periodo de preoviposición 9 veces menor que a 15 °C. El efecto de la temperatura también es notable en la fecundidad de otras especies de Orius. El estudio de [6] mostró una disminución de un 55% en la fecundidad de *O. laevigatus* y un 77% en la de *O. strigicollis* al bajar la temperatura de 25 a 15 °C, al igual que [7], donde también comprobaron que la fecundidad diaria de *O. strigicollis* fue mayor a 27°C que a 18,5°C.

El análisis estadístico ANOVA mostró que las poblaciones tratadas con temperatura de 26°C presentaron diferencias significativas ($F=20,92$; $g.l.=4/198$; $P=0,000$) entre los valores de sus FDM, excepto las poblaciones Mérida y Logroño que no presentaban diferencias entre ellas. Se distingue la población Agrobío con la mayor FDM ($15,54 \pm 0,53$) a diferencia del resto de poblaciones silvestres que presentan una FDM más baja. Esta razón puede darse por la mejor adaptación de la población Agrobío a la alimentación con huevos de *Ephestia* en la biofábrica, al contrario que el resto de poblaciones. En cuanto al tratamiento a 15°C, también se dieron diferencias significativas entre las poblaciones ($F=3,76$; $g.l.=4/228$; $P=0,006$). Al contrario que el tratamiento a 26°C, Agrobío presenta baja FDM ($1,27 \pm 0,08$) en comparación con el resto de poblaciones silvestres, siendo Cazorla ($1,64 \pm 0,08$) la de mayor fecundidad. Esto puede ser debido a que la población Cazorla esté mejor adaptada a las bajas temperaturas, viéndose menos afectada la fecundidad de la población.

4. CONCLUSIONES

Este estudio demuestra que la reproducción de *O. laevigatus* está altamente influenciada por las variaciones de temperatura. Además, existe una variación genética natural entre poblaciones en su adaptación a bajas temperaturas. Por ello, es posible la mejora genética de este insecto hacia una mayor capacidad de adaptación al frío, posibilitando un establecimiento de esta especie en los invernaderos en épocas invernales. De esta manera sería posible controlar la plaga de manera más efectiva, consiguiendo una disminución de daños en frutos y reducción en la transmisión de enfermedades ocasionadas por el trips, con el fin de obtener un mayor beneficio económico de la explotación agrícola.

5. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el proyecto PID2020-116897RB-I00 financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y la Agencia Estatal de Investigación

MCIN/AEI/10.13039/501100011033. El contrato de A.R.-G. fue cofinanciado por el Plan de Apoyo a la I+D+i de la Universidad Politécnica de Cartagena. El contrato de V. B. fue financiado por proyecto PDC2021-121383-I00 financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y la Agencia Estatal de Investigación MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y European Union Next Generation EU/PRTR. El contrato de A.B.A. fue cofinanciado por la ayuda 21578/FPI/21 de la Fundación Séneca (Región de Murcia) y Agrobío. El contrato de I.S.-M. fue financiado por el proyecto PLEC2021-007774 financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y la Agencia Estatal de Investigación MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y European Union Next Generation EU/PRTR.

6. REFERENCIAS

1. Amor, F. (2013). Compatibilidad de *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) y *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae), depredadores importantes en cultivos hortícolas protegidos, con nuevas barreras físicas selectivas y modernos plaguicidas. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.
2. Sanchez JA and Lacasa A. (2002) Modelling population dynamics of *Orius laevigatus* and *O. albidipennis* (Hemiptera: Anthocoridae) to optimize their use as biological control agents of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). Bull Entomol Res 92:77-88.
3. McDonald JR, Bale JS and Walters KF. (1998). Effect of temperature on development of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). Eur J Entomol 95:301-306.
4. Mendoza J.E, Balanza V, Garre-Carrasco M and Bielza P. (2015). Cold-tolerance variability in different Mediterranean populations of *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae). 4th Workshop on Agri-food Research - WiA.15. Cartagena, Murcia, Spain. 11-12 May 2015.
5. Bielza P, Balanza V, Cifuentes D and Mendoza JE. (2020). Challenges facing arthropod biological control: identifying traits for genetic improvement of predators in protected crops. Pest Management Science 76: 3517-3526.
6. Jeong-Hwan, K., Hwang-Yong, K., YoungWoong, B. and Yong-Heon, K. (2008). Biological characteristics of two natural enemies of thrips, *Orius strigicollis* (Poppius) and *O. laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae). Korean J. Appl. Entomol. 47 (4): 421-428.
7. Ren X, Li X, Huang J, Zhang Z, Hafeez M, Zhang J, Chen L, Zhou S, Zhang L and Lu Y. (2022) Linking life table and predation rate for evaluating temperature effects on *Orius strigicollis* for the biological control of *Frankliniella occidentalis*. Front. Sustain. Food Syst. 6:1026115. doi: 10.3389/fsufs.2022.102611.

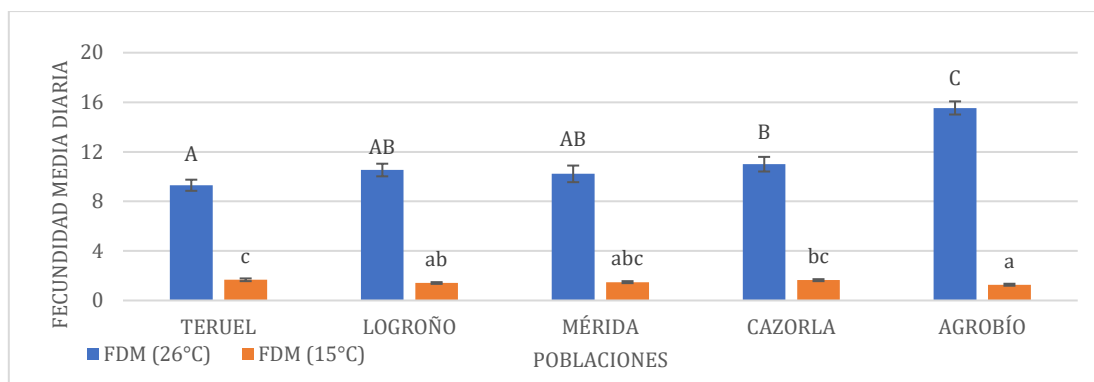


Figura 1. Diferencias en la Fecundidad Diaria Media de las distintas poblaciones de *Orius laevigatus* ensayadas en función de la temperatura.

Efecto de la desinfección del suelo sobre el cultivo de espinaca baby-leaf (*Spinacia oleracea*)

Effect of soil disinfection on baby-leaf spinach (*Spinacia oleracea*) cultivation

A. Hernández-Lara*, M. Ros, J.A. Pascual

Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC). Campus Universitario de Espinardo, 30100, Murcia, España.

*ahernandez@cebas.csic.es

Resumen

La radiación solar más la adición de compost es un uso práctico para la desinfección del suelo que podría tener efectos sobre el cultivo establecido posteriormente, en nuestro caso las espinacas. Se ha comparado la calidad de las hojas de espinaca después de dos tipos de desinfección del suelo: suelo no enmendado (SNE) y suelo enmendado con compost (SEC) para intentar encontrar biomarcadores de ambos tipos de desinfección. Estas prácticas no mostraron diferencias significativas en los niveles N total y COT (carbono orgánico total con respecto al suelo control (CS). Sin embargo, la cantidad de antinutrientes como el NO²⁻ y NO³⁻ fue significativamente menor en CAS y NAS que en CS. Ambos tipos de suelos desinfectados produjeron concentraciones más altas de flavonoides individuales en hojas de espinaca. El análisis de Cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas precisa de alta resolución (HPLC-HRAMS) mostró que cuatro compuestos podrían identificarse como marcadores de espinacas cultivadas en SEC, y, además, mejoraron la calidad de la hoja de espinaca.

Palabras clave: nutrientes minerales; compuestos bioactivos; compost; solarización.

Abstract

Solar radiation plus the addition of compost is a practical use for soil disinfection that could have effects on the crop established later, in our case spinach. The quality of spinach leaves after two types of soil disinfection has been compared: non amended soil (SNE) and soil amended with compost (SEC) to try to find biomarkers of both types of disinfection. These practices did not show significant differences in the total N and COT (total organic carbon) levels with respect to the control soil (SC). However, the amount of antinutrients such as NO²⁻ and NO³⁻ was significantly lower in CAS and NAS than in CS. Both types of disinfected soils produced higher concentrations of individual flavonoids in spinach leaves. Analysis of high performance liquid chromatography-high-resolution accurate mass spectrometry (HPLC-HRAMS) showed that four compounds could be identified as markers of SEC-grown spinach, and, in addition, they improved spinach leaf quality.

Keywords: mineral nutrients; bioactive compounds; compost; solarization.

1. INTRODUCCIÓN

La radiación solar eleva la temperatura del suelo a través del calor pasivo que se puede utilizar para el control de plagas y patógenos que se encuentran en el suelo (1). Además, el suelo expuesto a la radiación solar libera más nutrientes solubles, mejorando el crecimiento y rendimiento de las plantas (2) y aumentando metabolitos beneficiosos en hojas de cultivos (2). La eficacia de la desinfección del suelo mediante la radiación solar puede en ocasiones ser mejorado

significativamente al combinarlo con enmiendas orgánicas, tales como verde y estiércol animal, residuos de cultivos o compost (1,2). La espinaca baby leaf es una de las verduras muy saludables debido a los nutrientes (vitaminas y minerales) y los compuestos bioactivos que promueven la salud que contiene (3). Sin embargo, las hojas de espinaca también pueden acumular altos niveles de antinutrientes (oxalatos y nitratos), que pueden considerarse nocivos para la salud (4). Los compuestos bioactivos como fenoles y flavonoides son componentes nutricionales naturales de las plantas y productos alimenticios que promuevan la salud humana (5).

El objetivo de este trabajo fue comprobar si la desinfección del suelo puede mejorar la captación de nutrientes y compuestos bioactivos en las hojas de espinacas. También estudiaremos si pueden identificarse nuevos compuestos que actúen como biomarcadores de SNE y SEC a través del análisis no dirigido por HRAMS en espinaca.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Experimento de campo y muestreo

Se utilizaron nueve parcelas con dos tratamientos y tres repeticiones de cada tratamiento. Los tratamientos fueron: suelo no enmendado (SNE), el suelo se cubrió con plástico de polietileno transparente; suelo enmendado con compost (SEC), el suelo se mezcló con compost agroindustrial (72% de poda de viñedo y 28% de residuo de puerro); y suelo control (CS). En julio de 2020 se dispuso la cubierta de polietileno transparente sobre las parcelas, en noviembre de 2020 se retiró. En diciembre de 2022 las semillas de espinaca (*Spinacia oleracea* L, variedad Nembus) se sembraron. Las plantas fueron cosechadas después de 40 días, en febrero de 2021.

2.2 Propiedades químicas

El N total y COT total fueron medidos por ICP-OES (ICAP 6500 DUO). Nitratos (NO_3^-) y nitritos (NO_2^-) se determinaron mediante cromatografía iónica utilizando una columna Metrosep A SUPP 5 (Metrohm AG, Zofingen, Suiza) a un caudal de $0,7 \text{ ml min}^{-1}$.

2.3 Análisis de fenoles y flavonoides

El contenido total de fenoles fue determinado usando el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu.

Los flavonoides en las hojas de espinaca fueron determinados mediante cromatografía líquida de alta resolución junto con detección de matriz de fotodiodos y espectrometría de masas con trampa de iones/ionización por electropulverización (HPLC-DAD-ESI/MSn).

2.4 Análisis no dirigido usando HRAMS

Para evaluar las variaciones en el contenido de compuestos bioactivos naturales de las hojas de espinacas se utilizó UHPLC Dionex™ Ultimate 3000 (Thermo Scientific™, San Jose, USA).

2.5 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando IBM Statistics SPSS 23.0 software. Se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) en los distintos parámetros.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha demostrado que SNE y SEC inducen cambios en el suelo, principalmente al aumentar la disponibilidad de ciertos nutrientes en el suelo (2). Esto aumenta la solubilidad de los nutrientes, promueve un crecimiento más rápido de las plantas y da como resultado mayores rendimientos debido al control de malezas y enfermedades.

Los nutrientes juegan un papel crucial en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los valores obtenidos (datos no mostrados) estuvieron dentro del rango de otros autores (6). El contenido de NO_3^- en las hojas de espinaca mostró valores por debajo de los límites legales de la

UE (<3500 mg kg⁻¹ FW) (Tabla 1). Además, las espinacas cultivadas en SNE y SEC mostraron una mejor cantidad de NO₂⁻ y NO₃⁻ que las cultivadas en SC (Tabla 1).

Las espinacas cultivadas en SNE y SEC mostraron un mayor contenido de fenoles totales que las cultivadas en SC (Tabla 1), debido al aumento de la actividad microbiana causado por la materia orgánica y el aumento de temperatura (7). De la misma manera, las espinacas cultivadas en SNE y SEC mostraron un mayor contenido en flavonoides que las cultivadas en SC (Tabla 1), esto les proporcionó a las espinacas una mayor actividad antioxidante y una mayor resistencia a las enfermedades (8).

Los perfiles de metabolitos variaron entre los diferentes tipos de desinfección siendo más abundantes en las espinacas en suelos desinfectados que en el suelo control. Estos compuestos podrían ser un marcador del suelo desinfectado (SNE y SEC) (Tabla 1). Además, son beneficiosos para la salud humana (9) y promueven la actividad microbiana y antifúngica de patógenos (10).

4. CONCLUSIONES

El efecto de NAS y CAS produjo una disminución en el contenido de compuestos antinutricionales (NO₃⁻, NO₂⁻). Ambos tratamientos desinfectados mostraron un mayor contenido en fenoles totales y en compuestos flavonoides que las espinacas cultivadas en SC. El análisis no dirigido utilizando HRAMS tuvo la suficiente resolución para identificar metabolitos en hojas de espinacas cultivadas en SNE y SEC.

5. AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad por la financiación recibida para llevar a cabo el proyecto AGL 2017-84085-C3-1-R.

6. REFERENCIAS

1. Achmon Y, Claypool JT, Fernández-Bayo JD, Hernandez K, McCurry DG, Harrold DR, et al. Structural changes in bacterial and fungal soil microbiome components during biosolarization as related to volatile fatty acid accumulation. *Appl Soil Ecol.* 2020;153:103602.
2. Gelsomino A, Badalucco L, Landi L, Cacco G. Soil carbon, nitrogen and phosphorus dynamics as affected by solarization alone or combined with organic amendment. *Plant Soil.* 2006;279(1):307–25.
3. Nemzer B, Al-Taher F, Abshiru N. Extraction and natural bioactive molecules characterization in spinach, kale and purslane: A comparative study. *Molecules.* 2021;26(9):2515.
4. Mou B. Evaluation of oxalate concentration in the US spinach germplasm collection. *HortScience.* 2008;43(6):1690–3.
5. Giménez A, Egea-Gilabert C, Pascual JA, Ros M, Fernández JA. Effect of the application of a compost tea in the production of baby leaf lettuce in a floating system. In: XI International Symposium on Protected Cultivation in Mild Winter Climates and I International Symposium on Nettings and 1268. 2019. p. 173–8.
6. El-Nakhel C, Pannico A, Graziani G, Kyriacou MC, Giordano M, Ritieni A, et al. Variation in macronutrient content, phytochemical constitution and in vitro antioxidant capacity of green and red butterhead lettuce dictated by different developmental stages of harvest maturity. *Antioxidants.* 2020;9(4):300.
7. Conant RT, Ryan MG, Ågren GI, Birge HE, Davidson EA, Eliasson PE, et al. Temperature and soil organic matter decomposition rates—synthesis of current knowledge and a way forward. *Glob Chang Biol.* 2011;17(11):3392–404.
8. Cho MJ, Howard LR, Prior RL, Morelock T. Flavonoid content and antioxidant capacity of spinach genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Sci Food Agric.* 2008;88(6):1099–106.
9. Yan J, Qiu P, Zhang X, Zhang Y, Mi L, Peng C, et al. Biochanin A from Chinese Medicine: An Isoflavone with Diverse Pharmacological Properties. *Am J Chin Med.* 2021;49(7):1623–43.
10. Mirgorodskaya AB, Kushnazarova RA, Lukashenko SS, Nikitin EN, Sinyashin KO, Nesterova LM, et al. Carbamate-bearing surfactants as effective adjuvants promoted the penetration of the herbicide into the plant. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2020;586:124252.

Tabla 1. Efecto de la enmienda de compost y solarización en el suelo sobre el cultivo de la espinaca (*Spinacia oleracea*).

Calidad de las espinacas				
	SC	SNE	SEC	p-valor
N total (g Kg ⁻¹)	48.81±0.08	48.21±0.46	51.61±3.09	NS
COT (g Kg ⁻¹)	331.47±3.04	329.43±0.32	329.90±10.66	NS
NO ₃ ⁻ (mg Kg ⁻¹ FW)	228.35±30.64a	101.77±8.90c	161.22±18.88b	***
NO ₂ ⁻ (mg Kg ⁻¹ FW)	114.39±15.61a	49.99±13.33c	65.74±3.29b	***
Fenoles (mg GA g⁻¹ FW)				
Fenoles totales	856±35b	974±48a	932±30ab	*
Compuestos flavonoides (mg g⁻¹ DW)				
	SC	SNE	SEC	p-valor
Patuletin 3-glucosyl-(1-6)[apiosyl(1-2)]glucoside	0.445±0.006 b	0.530±0.016 a	0.489±0.018 a	***
Patuletin 3-O-gentiobioside	0.214±0.003 c	0.243±0.008 a	0.223±0.009 b	***
Spinacetin-3-glucosyl-(1-6)[apiosyl(1-2)-glucoside]	0.325±0.006 b	0.394±0.014 a	0.382±0.015 a	***
Spinacetin 3-O-gentiobioside	0.530±0.012 b	0.646±0.022 a	0.612±0.024 a	***
Spinacetin glucuronide (Spinatoside)	0.887±0.064 b	1.065±0.029 a	1.006±0.043 a	**
Jaceidin glucuronide	0.281±0.007 c	0.350±0.012 a	0.324±0.013 b	***
5,3',4'-trihydroxy-3-methoxy-6:7-methylenedioxyflavone-4'-glucuronide	0.476±0.010 c	0.580±0.017 a	0.526±0.024 b	***
5,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-6:7-methylenedioxyflavone-4'-glucuronide	0.127±0.011 c	0.172±0.006 a	0.152±0.007 b	***
Área de los picos identificados por HRAMS (log₁₀)				
	SC	SNE	SEC	p-valor
Pentadecan-8-amine	6.49±0.04b	5.89±0.06c	6.66±0.04a	***
Olmelin (compuesto fenólico)	6.18±0.01c	6.97±0.02b	7.07±0.03a	***
1,1-Dimethylethyl N-(4-aminobutyl)-N-methylcarbamate	7.84±0.02b	7.73±0.03c	8.03±0.01a	***
2-Methyl-2-propanyl (2-aminoethyl) {[3-(diethylamino) propyl] carbamoyl} carbamate	6.92±0.01b	6.76±0.03c	7.09±0.03a	***
(E)-p-coumaric acid (compuesto fenólico)	6.57±0.06	6.70±0.03	6.67±0.03	NS
L-Phenylalanine (amino ácido)	8.95±0.01c	9.27±0.01a	9.24±0.01b	***
Dopamine	5.69±0.16b	6.60±0.06a	6.55±0.04a	***
DL-Tryptophan (amino ácido)	8.68±0.01b	9.06±0.06a	9.06±0.08a	***
D-Pantothenic acid (vitamina)	7.69±0.01b	7.94±0.02a	7.91±0.01a	***
BOC-D-GLU(OALL)-OH (amino ácido)	6.47±0.16b	7.44±0.08a	7.34±0.06a	***

Los asteriscos indican diferencias significativas * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; NS: no significativo. Las diferentes letras indican las diferencias significativas. Los valores son la media ± desviación estándar (n = 4). COT: carbono orgánico total; SC: suelo control; SNE: suelo no enmendado; SEC: suelo enmendado con compost.

Ciclo cerrado: aprovechar el drenaje del compost agroindustrial para cultivar hinojo marino (*Crithmum maritimum* L.) en un sistema flotante

Closing the cycle: leverage agroindustrial compost leachate to cultivate sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) in a floating system

F. Amoruso^{1*}, A. Signore¹, V.M. Gallegos-Cedillo¹, J. Ochoa¹, C. Egea-Gilabert^{1,2}, P.A. Gómez², F. Orsini³, G. Pennisi³, E. Appollonie³, J.A. Fernández^{1,2}

¹Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. P^o Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

²Instituto de Biotecnología Vegetal. Edificio I+D+I. Universidad Politécnica de Cartagena. Campus Muralla del Mar, 30202, Cartagena, Murcia, España.

³Departamento de Ciencias y Tecnologías Agrarias y Alimentarias. Universidad de Bologna, Italia.

*fabio.amoruso@upct.es

Resumen

El objetivo de este estudio fue producir hinojo marino reduciendo la descarga de nutrientes mediante sistemas de cultivo en cascada (SCC). Los SCC consistían en un cultivo primario de rúcula [*Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC] cultivada en dos sustratos de cultivo: compost y turba. El drenaje recogido se utilizó para cultivar hinojo marino (*Crithmum maritimum* L.) en un sistema flotante con los siguientes tratamientos: T1-100% drenaje de turba; T2-100% drenaje de compost; T3-mezcla de drenaje de turba y SN (50%/50%); T4-mezcla de drenaje de compost y SN (50%/50%); T5-100% SN. La reutilización del drenaje de compost como SN produjo un mayor rendimiento, uso eficiente de agua (WUE) y uso eficiente de nitrógeno (NUE) que la reutilización del drenaje de turba. Se necesita más investigación para optimizar el porcentaje de drenaje reutilizado para maximizar el rendimiento y la calidad del hinojo marino en un sistema flotante.

Palabras clave: Rúcula; uso eficiente de agua; economía circular.

Abstract

The objective of this study was to produce sea fennel reducing the nutrients unload by closing the cascade cropping systems (CCS). The CCS consisted of a primary crop of rocket salad [*Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC] cultivated in two different growing media: agro-industrial compost and peat. The collected drainage was used to cultivate sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) in a floating system with the following treatments: T1 - 100% peat leachate; T2 - 100% compost leachate; T3 - mixture of peat leachate and fresh nutrient solution (NS) (50/50 v/v); T4 - mixture of compost leachate and fresh NS (50/50 v/v); T5-100%fresh NS. Reusing compost drainage at 100% as a NS produced higher yield, water use efficiency (WUE) and nitrogen use efficiency (NUE) than reusing peat drainage. However, further research is needed to optimize the percentage of reused drainage to maximize yield and quality of sea fennel in a floating system.

Keywords: Rocket salad; water use efficiency; circular economy.

1. INTRODUCCIÓN

El agua tiene un papel clave en la producción agrícola y la seguridad alimentaria. Por ello, el reciclaje del agua es un tema muy investigado dentro de la agricultura sostenible. Dentro de estas premisas, los sistemas cerrados de cultivo sin suelo y, en particular, los sistemas de cultivo en cascada (SCC) - los sistemas que recogen el drenaje del cultivo principal para cultivar cultivos secundarios - son de especial interés en entornos naturalmente secos, con escasez de agua y pobres en nutrientes como los de la costa de los países mediterráneos (1). SCC necesita dos características principales para generar circularidad y eficiencia de los recursos: la combinación adecuada de cultivos para reducir los aportes de agua y nutrientes y, en segundo lugar, encontrar un cultivo secundario tolerante a la sal (2). La halófito comestible hinojo marino (*Crithmum maritimum* L.) podría ser un buen candidato como cultivo secundario, ya que se puede cultivar hidropónicamente en una solución de nutrientes salinos, mejorando la calidad del producto crudo y la vida útil después de la cosecha como un vegetal "listo para comer" (3). Por lo tanto, el enfoque clave de este estudio es lograr un uso eficiente del agua y los nutrientes mediante el cierre del sistema de cultivo en cascada utilizando lixiviados de un cultivo primario hecho con ensalada de rúcula cultivada en compost y con hinojo marino como cultivo secundario cultivado en un sistema flotante con estos lixiviados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Todo el experimento se desarrolló en la Estación Experimental Agroalimentaria de la Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT; lat. 37°41' N; long. 0°57' O).

2.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento de la rúcula

Las plántulas de rúcula [*Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC.], cv. 'Apollo' se trasplantaron en canaletas metálicas (3 marzo 2022), rellenos de turba o de un compost agroindustrial como medio de cultivo. Después del trasplante, se aplicó diariamente solución nutritiva (SN) con la siguiente composición: 7,2 mM NO₃⁻, 4,8 mM NH₄⁺, 2 mM H₂PO₄⁻, 2,5 mM SO₄²⁻, 6 mM K⁺, 1,9 mM Ca²⁺ y 1,5 mM Mg²⁺ más una solución comercial de microelementos Nutromix® (2 mg L⁻¹) y Sequestrene® G100 Syngenta (un quelato de hierro al 6% - 1,5 mg L⁻¹). Además, los lixiviados de cada medio de cultivo se recogieron en tanques separados y se midieron.

2.2 Material vegetal y condiciones de crecimiento de hinojo marino

El experimento se realizó del 4 de mayo (siembra) al 18 de julio (cosecha). La siembra de hinojo marino (*Crithmum maritimum* L.) se realizó de forma manual en bandejas de poliestireno rellenas de turba, y colocadas en mesa de flotación lleno de agua de lluvia con una CE de 0,52 dS·m⁻¹. Un mes después de la siembra, las mesas se llenaron con 230 litros de SN. Los tratamientos fueron los siguientes: T1 - 100% drenaje de turba; T2 - 100% drenaje de compost; T3 - mezcla de drenaje de turba y SN (50%/50%); T4 - mezcla de drenaje de compost y SN (50%/50%); T5 - 100% SN cuya concentración fue 0.6 de la utilizada en el cultivo de rúcula. La cosecha se realizó cuando las plantas alcanzaron la etapa de 10-12 hojas verdaderas.

2.3 Diseño experimental y análisis estadístico

En el invernadero se utilizó un diseño de bloques completos aleatorizados con tres repeticiones (mesas de flotación). Cada mesa tenía tres bandejas flotantes de 60 cm × 41 cm. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA unidireccional). Los datos se analizaron con Statgraphics Centurion 19 (The Plains, VA, EE.UU.). La separación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey a P ≤ 0,05.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el experimento, ambos medios de cultivo tuvieron un contenido de agua relativamente alto, confirmado por un potencial mátrico del agua similar (entre 1 y 5 kPa). Por lo

tanto, la fracción de lixiviación durante todo el período de crecimiento fue de 0,18 en el compost y de 0,21 en la turba. La composición química de estos lixiviados se muestra en la Tabla 1, donde se puede observar que no hubo diferencias significativas en la concentración iónica, pH y CE entre los lixiviados. La relación nitrato/amonio alcanzó valores superiores a 1,5 en T3 y T5, significativamente superiores al resto de tratamientos, mientras la relación cloruro/nitrato mostró el valor más alto en T1, siendo este tratamiento significativamente superior a T3, T4 y T5. T4 mostró una relación entre 2 y 3, mientras que T3 y T5 tuvieron valores entre 1 y 2. En presencia de altas concentraciones de cloruro, la captación de nitrato podría ser inhibida debido a la interacción de transporte iónico entre estos iones (4). La CE aumentó en todos los tratamientos al final del experimento con respecto a los valores iniciales. Además, este parámetro podría verse afectado como consecuencia de la solubilización de sales debida a las variaciones de pH. La mayor producción de hinojo marino se obtuvo en T3 ($0,7 \text{ kg m}^{-2}$), mientras que la menor se encontró en T1 ($0,2 \text{ kg m}^{-2}$). Las plantas cultivadas en lixiviado de compost (T2) incrementaron el rendimiento en un 137% respecto a las cultivadas en lixiviado de turba (T1). El número de hojas por planta en T5 fue el doble que en T1, mientras que T2, T3 y T4 produjeron, en promedio, seis hojas, sin diferencias significativas entre ellos. El área foliar máxima fue de $211 \text{ mm}^2 \text{ planta}^{-1}$ en T3, la cual fue 258% mayor que T1, 87% y 128% mayor que T2 y T4, respectivamente, mientras que T5 disminuyó 29% con respecto a T3. En este trabajo, el rendimiento y el área foliar tienen una estrecha correlación positiva, ya que los tratamientos con mayor LA tuvieron mayor rendimiento. En promedio, el SLA en T3 fue 138% mayor que en el resto de los tratamientos y es un buen indicador del rendimiento de la planta (5). En cuanto a los parámetros radiculares volumen radicular, el T2 presentó el valor más bajo (147% inferior al T4), probablemente debido a la mayor presencia de sales (CE) en la solución nutritiva en comparación con los otros tratamientos, ya que las raíces son la primera parte de la planta que se encuentra con la salinidad y, por lo tanto, se ven afectadas de forma más marcada por las condiciones mencionadas (6). Se observaron algunas diferencias en cuanto al contenido de iones en las hojas de hinojo marino. T1 tenían el menor contenido de N (NO_3^- y NH_4^+), y el mayor contenido de Cl^- y Na^+ (Tabla 2). En consecuencia, la relación $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ alcanzó el valor más alto en T1. Los mayores contenidos de nitratos en las hojas de hinojo marino se encontraron en T5 y T3, pero fueron muy inferiores al máximo legislado en la UE (Reglamento (CE) nº 1258/2011 de la Comisión) para otras hortalizas de hoja. El contenido de Cl^- fue mayor que el de Na^+ en todos los tratamientos, lo que indica un mecanismo regulador para retener el Na^+ lejos de las hojas de las plantas de hinojo marino (3). En este estudio, la relación K^+/Na^+ osciló entre 1,9 y 4,2 cercano al valor de 3 a 4 que se considera el más adecuado en especies halófitas para la retención normal de proteínas durante el crecimiento (Guil et al., 1997), evitando los efectos de la toxicidad por Na^+ (7). WUE tuvo el valor más alto en T3, con un incremento del 240% respecto a T1. Además, el valor de T3 fue un 64% y un 59% superior al de T4 y T5, respectivamente. Además, las plantas cultivadas en T2 produjeron un WUE significativamente mayor que T1. En cuanto a la NUE, los valores más altos se obtuvieron en T3 y T5, que tenían el mayor contenido inicial de N (NO_3^- y NH_4^+) en la NS, mientras que T1 tuvo el valor más bajo, lo que coincide con los resultados obtenidos en otras especies cultivadas en sistemas flotantes (8).

4. CONCLUSIONES

El uso de un SCC que recoja el drenaje de un cultivo de cohetes para cultivar hinojo marino en un sistema flotante puede generar circularidad y eficiencia de los recursos, logrando beneficios ecosistémicos, logrando beneficios ecosistémicos y reduciendo la contaminación ambiental aguas abajo. Estos prometedores resultados ponen de relieve que es necesario seguir investigando para optimizar la producción de hinojo marino en sistema flotante reutilizando el lixiviado de un cultivo anterior.

5. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se enmarca en el proyecto Agricultura urbana innovadora para una producción sostenible (Proyecto PID2020-114410RB-I00) financiado por MCIN /AEI /10.13039 /501100011033. Esta investigación ha recibido financiación externa a través de una ayuda posdoctoral Margarita Salas del Ministerio de Universidades y de la Unión Europea.

6. REFERENCIAS

1. Santos MG, Moreira GS, Pereira R, Carvalho SMP. Assessing the potential use of drainage from open soilless production systems: A case study from an agronomic and ecotoxicological perspective. *Agric Water Manag.* 2022 Nov 1;273.
2. Katsoulas N, Stanghellini C. Modelling crop transpiration in greenhouses: Different models for different applications. Vol. 9, *Agronomy*. MDPI AG; 2019.
3. Amoruso F, Signore A, Gómez PA, Martínez-Ballesta MC, Giménez A, Franco JA, et al. Effect of Saline-Nutrient Solution on Yield, Quality, and Shelf-Life of Sea Fennel (*Crithmum maritimum* L.) Plants. *Horticulturae*. 2022;8(2).
4. Aslam M, Huffaker RC, Rains DW. Early Effects of Salinity on Nitrate Assimilation in Barley Seedlings' NO₃-uptake was determined at 2-h intervals in light [Internet]. Vol. 76, *Plant Physiol*. 1984. Available from: <https://academic.oup.com/plphys/article/76/2/321/6084390>
5. Gallegos-Cedillo VM, Diáñez F, Nájera C, Santos M. Plant agronomic features can predict quality and field performance: a bibliometric analysis. Vol. 11, *Agronomy*. MDPI; 2021.
6. Ben Hamed K, Castagna A, Salem E, Ranieri A, Abdelly C. Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) under salinity conditions: A comparison of leaf and root antioxidant responses. *Plant Growth Regul.* 2007 Dec;53(3):185-94.
7. Flowers TJ, Munns R, Colmer TD. Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. Vol. 115, *Annals of Botany*. Oxford University Press; 2015. p. 419-31.
8. Miceli A, Moncada A, Sabatino L, Vetrano F. Effect of gibberellic acid on growth, yield, and quality of leaf lettuce and rocket grown in a floating system. *Agronomy*. 2019 Jul 16;9(7).

Tabla 1. Concentración iónica (mM), pH y CE (dS m⁻¹) en cada tratamiento de hinojo marino al inicio del experimento.

Ion (mM)	T1	T2	T3	T4	T5
NO ₃ ⁻	1.6 ± 0.3 b	1.9 ± 0.3 b	3.6 ± 0.1 a	2.2 ± 0.4 b	4.2 ± 0.2 a
NH ₄ ⁺	1.8 ± 0.5 b	1.6 ± 0.2 b	2.2 ± 0.2 a	1.7 ± 0.2 b	2.3 ± 0.5 a
PO ₄ ⁻	0.9 ± 0.3 b	0.6 ± 0.2 b	1.4 ± 0.4 a	0.8 ± 0.1 b	1.7 ± 0.2 a
K ⁺	0.7 ± 0.4 b	1.3 ± 0.4 b	2.4 ± 0.2 ab	1.7 ± 0.2 b	3.3 ± 0.2 a
Ca ²⁺	0.8 ± 0.3 b	1.1 ± 0.1 b	1.6 ± 0.3 ab	1.3 ± 0.1 a	2.0 ± 0.3 a
Mg ²⁺	0.4 ± 0.3 b	0.4 ± 0.4 b	1.3 ± 0.3 a	0.7 ± 0.1 b	1.7 ± 0.5 a
Cl ⁻	6.3 ± 0.2 a	6.5 ± 0.1 a	5.3 ± 0.3 ab	6.2 ± 0.8 a	4.8 ± 0.6 b
Na ⁺	5.1 ± 0.2 a	6.7 ± 0.1 a	4.9 ± 0.2 a	6.3 ± 0.2 a	4.7 ± 1.1 a
SO ₄ ²⁻	2.1 ± 0.3 a	2.0 ± 0.3 a	2.1 ± 0.1 a	2.1 ± 0.2 a	2.2 ± 0.5 a
pH	7.9 ± 0.3 a	7.7 ± 0.1 a	6.9 ± 0.1 a	7.3 ± 0.1 a	7.0 ± 0.2 a
EC (dS m ⁻¹)	2.9 ± 0.2 a	3.2 ± 0.4 a	3.1 ± 0.2 a	3.4 ± 0.1 a	3.5 ± 0.4 a

Todos los datos representan el valor medio ± SE (n = 3). Letras distintas en las filas indican diferencias significativas entre tratamientos P ≤ 0,05.

Tabla 2. Contenido de iones (NO₃⁻, NH₄⁺, K⁺, Cl⁻, Na⁺) (mg kg⁻¹ FW) y ratios Cl⁻/NO₃⁻ and K⁺/Na⁺ en la cosecha en hojas de *C. maritimum* cultivadas bajo diferentes tratamientos.

Ion	T1	T2	T3	T4	T5
NO ₃ ⁻	36.9 ± 0.2 c	33.5 ± 0.1 c	161.8 ± 42.3 b	41.0 ± 1.7 c	214.9 ± 13.2 a
NH ₄ ⁺	31.8 ± 3.2 e	131.1 ± 24.0 d	597.7 ± 18.1 b	274.3 ± 12.5 c	697.0 ± 14.4 a
K ⁺	6629.2 ± 33.3 b	6707.5 ± 27.0 b	4669.2 ± 57.9 c	7712.6 ± 13.6 a	6737.4 ± 79.2 b
Cl ⁻	8141.9 ± 119.8 a	6234.3 ± 15.9 c	6129.9 ± 30.0 c	7610.9 ± 31.0 b	5801.2 ± 30.6 d
Na ⁺	2812.7 ± 15.6 a	1829.5 ± 31.1 c	2475.0 ± 35.6 b	2390.5 ± 33.4 b	1606.0 ± 23.9 d
Cl ⁻ /NO ₃ ⁻	220.1 ± 4.6 a	188.9 ± 1.3 b	38.1 ± 12.6 c	185.6 ± 7.2 b	27.0 ± 1.8 c
K ⁺ /Na ⁺	2.4 ± 0.1 d	3.7 ± 0.1 b	1.9 ± 0.05 e	3.2 ± 0.1 c	4.2 ± 0.1 a

Values are the mean ± SE (n = 3). Different letters indicate statistically significant differences at P ≤ 0.001.

Efecto de la aplicación de fertilizantes inorgánicos y té de compost sobre la diversidad taxonómica y funcional de la rizosfera de verdolaga

Effects of inorganic and compost tea fertilizers application on the taxonomic and functional microbial diversity of the purslane rhizosphere

A. Carrascosa*¹, J. A. Pascual¹, A. López-García², M. Romo-Vaquero³, A. DeSantiago⁴, M. Ros¹, S. A. Petropoulos⁵, M.M. Alguacil¹

¹Grupo de Enzimología y Biorremediación de Suelos y Residuos Orgánicos. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)-CSIC. Campus Universitario de Espinardo, 30100, Espinardo, Murcia, España.

²Grupo de ecología, evolución y conservación de la vegetación Mediterránea. Universidad de Jaén. Campus Las Lagunillas s/n. 23071, Jaén, España.

³Grupo de Calidad, Seguridad y Bioactividad de Alimentos Vegetales. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)-CSIC. Campus Universitario de Espinardo, 30100, Espinardo, Murcia, España.

⁴Área de Protección Vegetal. Subárea de gestión y usos de suelos agrícolas y forestales. Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), Autovía A5, km 372. 06187, Guadajira, Badajoz, España.

⁵Departamento de Agricultura, Producción Agrícola y Medio Rural. Universidad de Tesalia. Calle Fytokou, Volos, 384 46, Grecia.

*angel.carrascosa@eez.csic.es

Resumen

La fertilidad del suelo es determinante en las asociaciones planta - microorganismos, afectando tanto a la productividad de los cultivos como a la funcionalidad de los ecosistemas. En este estudio evaluamos diferentes dosis de fertilizantes inorgánicos y té de compost en el cultivo de verdolaga y su efecto sobre el crecimiento de las plantas, calidad del suelo y la estructura y funcionalidad de las comunidades microbianas. Los tratamientos aumentaron la biomasa del tallo de verdolaga y aumentaron las actividades enzimáticas relacionadas con los ciclos biogeoquímicos del C, N y P. Todos los tratamientos afectaron a la composición fúngica y bacteriana, aunque los tratamientos inorgánicos redujeron la diversidad y funcionalidad microbiana del ecosistema.

Palabras clave: *Portulaca oleracea*; aplicación de nitrógeno; comunidades bacterianas; comunidades fúngicas; composición funcional.

Abstract

Soil fertility is determinant for plant-microorganism associations, affecting both crop productivity and ecosystem functionality. In this study, we evaluated the effect of different doses of inorganic fertilizers and compost tea on purslane cultivation and its effect on purslane growth parameters, soil quality, microbial community structure and functionality. Treatments increased purslane stem biomass and improved the enzymatic activities related to C, N and P biogeochemical cycles. All treatments affected fungal and bacterial composition, while inorganic treatments reduced microbial diversity and functionality of the ecosystem.

Keywords: *Portulaca oleracea*; nitrogen application; bacterial community; fungal community; functional composition.

1. INTRODUCCIÓN

La verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) es una especie salvaje comestible que ha llamado la atención para su cultivo en los últimos años principalmente por sus propiedades nutricionales y medicinales, debido a su alto contenido en ácidos grasos omega – 3 y antioxidantes (1).

Para aumentar la producción agrícola, tradicionalmente se han usado fertilizantes químicos inorgánicos (2), pero su uso conlleva diversos efectos negativos tanto para el ecosistema, como para la contaminación de aguas por nitratos o la acidificación del suelo (3), y también para la calidad del suelo, degradando la materia orgánica o disminuyendo la actividad biológica del suelo (2,4). Por otro lado, la aplicación de fertilizantes orgánicos puede mejorar la calidad del suelo (5) así como la abundancia, diversidad y funcionalidad de las comunidades microbianas (6,7). Los microorganismos del suelo juegan un papel clave en el funcionamiento del ecosistema, contribuyendo a la degradación de la materia orgánica, modelando los ciclos biogeoquímicos o la supresión de patógenos, por lo que en general, pueden contribuir a la producción agraria. (8).

El objetivo de este estudio es evaluar los cambios que diferentes dosis de fertilización inorgánica y té de compost causan al crecimiento de plantas de verdolaga, a parámetros de calidad del suelo y a la composición y funcionalidad de las comunidades microbianas del suelo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio con macetas en condiciones de invernadero en la finca experimental CEBAS-CSIC (Santomera, Murcia) por 3 meses con semillas de verdolaga sembradas directamente en maceta en abril 2021. El sustrato empleado fue una mezcla de suelo superficial de la propia finca mezclado con vermiculita y arena (1:1:1 v:v:v) en macetas de 2 litros.

2.1 Diseño experimental

El experimento consistió en cuatro tratamientos de fertilización inorgánica con diferentes dosis de NPK: IT1 300-100-100, IT2 300-200-100, IT3 300-200-200, IT4 600-100-100 (NPK ppm), un tratamiento orgánico de té de compost, OT, equivalente a 300 ppm de N y un tratamiento control sin fertilización. 7 réplicas por tratamiento. Los tratamientos se aplicaban semanalmente.

2.2 Parámetros físico-químicos

Se determinaron el pH, conductividad del suelo (EC), carbono, nitrógeno, fósforo y potasio total (CT, NT, PT y KT), fósforo disponible (PT), materia orgánica (MO) y carbono orgánico (CO).

2.3 Parámetros biológicos

Se determinaron la actividad β -glucosidasa, fosfatasa, ureasa y deshidrogenasa del suelo. También se estudió la comunidad microbiana por amplificación de la región ITS2 para hongos y de la región V3-V4 del rRNA 16S para bacterias. Las lecturas obtenidas se analizaron usando el pipeline DADA2 y la asignación taxonómica se realizó con las bases de datos UNITE 8.2 y SILVA r.132 para hongos y bacterias respectivamente. Para la funcionalidad fúngica se usó la base de datos Fungal Traits. La predicción de funciones metagenómicas bacterianas se realizó con PICRUSt.

2.4 Análisis estadístico

La normalidad y homocedasticidad se comprobaron usando los tests Kolmogorov-Smirnov y de Levene respectivamente. Los datos no normales fueron transformados de forma logarítmica. El efecto de los tratamientos se comprobó con un test ANOVA de una vía y las comparaciones de medias con un test Tukey HSD al 95% de confianza con lenguaje de programación R. Los análisis NMDS de distancias Bray Curtis y el perMANOVA se realizaron con el paquete “vegan” de R.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que todos los tratamientos de fertilización incrementaron el crecimiento de verdolaga, aunque en el caso del té de compost no igualó a su equivalente inorgánico en nitrógeno, posiblemente debido a la menor disponibilidad de nitrógeno (9). La actividad enzimática también aumento más en general en los tratamientos inorgánicos, posiblemente debido a una mayor cantidad de exudados radiculares causado por un mayor crecimiento de las plantas (10,11). Sin embargo, los tratamientos inorgánicos disminuyeron la diversidad microbiana, salvo para IT3, probablemente a causa del efecto positivo del K o P frente al uso aislado de N. (12). El análisis NMDS (Fig. 1) muestra la distribución de las comunidades microbianas del suelo en los tratamientos inorgánicos y orgánico, compartiendo el tratamiento orgánico y control la misma comunidad bacteriana. Sin embargo, la comunidad fúngica mostró una mayor sensibilidad a ambas fuentes de fertilización (13). También se encontró un aumento de los genes asociados a la oxidación de amonio (*amoA*, *amoB*, *amoC*) y a la desnitrificación (*nirK*) en los tratamientos inorgánicos con mayor nivel de nitrógeno, pero no en el tratamiento orgánico (Tab. 1), posiblemente debido a que la dosis aplicada no fue suficiente para provocar una respuesta funcional microbiana como ocurrió con los tratamientos con menor dosis de N.

4. CONCLUSIONES

Como conclusión, este estudio aporta nueva información sobre la respuesta microbiana a distintos tipos de fertilización en el cultivo de verdolaga. Nuestros resultados muestran como la fertilización inorgánica, pese a aumentar la productividad, puede generar una pérdida en la diversidad microbiana. Por ello, se necesita más investigación para estudiar sistemas de fertilización más sostenibles para la explotación comercial de verdolaga.

5. AGRADECIMIENTOS

Proyecto financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (PCI2020-112091) y fundación PRIMA, proyecto VALUEFARM (PRIMA/0009/2019).

6. REFERENCIAS

1. Petropoulos S, Karkanis A, Fernandes Á, Barros L, Ferreira ICFR, Ntatsi G, et al. Chemical Composition and Yield of Six Genotypes of Common Purslane (*Portulaca oleracea* L.): An Alternative Source of Omega-3 Fatty Acids. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2015 Dec 1;70(4):420–6.
2. Bebber DP, Richards VR. A meta-analysis of the effect of organic and mineral fertilizers on soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*. 2022 Jul 1;175:104450.
3. Bijay-Singh, Craswell E. Fertilizers and nitrate pollution of surface and ground water: an increasingly pervasive global problem. *SN Appl Sci*. 2021 Apr 1;3:518.
4. Tian J, Lou Y, Gao Y, Fang H, Liu S, Xu M, et al. Response of soil organic matter fractions and composition of microbial community to long-term organic and mineral fertilization. *Biol Fertil Soils*. 2017 Jul 1;53(5):523–32.
5. Lewu FB, Volova T, Thomas S, Rakhimol KR. Controlled Release Fertilizers for Sustainable Agriculture. *Controlled Release Fertilizers for Sustainable Agriculture*. Elsevier; 2020.
6. Jannoura R, Joergensen RG, Bruns C. Organic fertilizer effects on growth, crop yield, and soil microbial biomass indices in sole and intercropped peas and oats under organic farming conditions. *European Journal of Agronomy*. 2014 Jan;52:259–70.
7. Insam H, Gómez-Brandón M, Ascher J. Manure-based biogas fermentation residues - Friend or foe of soil fertility? *Soil Biol Biochem*. 2015 May 1;84:1–14.
8. Kuypers MMM, Marchant HK, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network. *Microbial Biogeochemistry Reviews*. 2018 May 1;16:263–76.
9. Wang R, Zhang H, Sun L, Qi G, Chen S, Zhao X. Microbial community composition is related to soil biological and chemical properties and bacterial wilt outbreak. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1).
10. Francioli D, Schulz E, Lentendu G, Wubet T, Buscot F, Reitz T. Mineral vs. organic amendments: Microbial community structure, activity and abundance of agriculturally relevant microbes are driven by long-term fertilization strategies. *Front Microbiol*. 2016 Sep 14;7:1446.

11. Murugan R, Parama VRR, Madan B, Muthuraju R, Ludwig B. Short-Term Effect of Nitrogen Intensification on Aggregate Size Distribution, Microbial Biomass and Enzyme Activities in a Semi-Arid Soil Under Different Crop Types. *Pedosphere*. 2019 Aug 1;29(4):483–91.
12. Wang F, Chen S, Wang Y, Zhang Y, Hu C, Liu B. Long-term nitrogen fertilization elevates the activity and abundance of nitrifying and denitrifying microbial communities in an upland soil: Implications for nitrogen loss from intensive agricultural systems. *Front Microbiol*. 2018 Oct 23;9:2424.
13. Freedman ZB, Romanowicz KJ, Upchurch RA, Zak DR. Differential responses of total and active soil microbial communities to long-term experimental N deposition. *Soil Biol Biochem*. 2015 Nov 1;90:275–82.

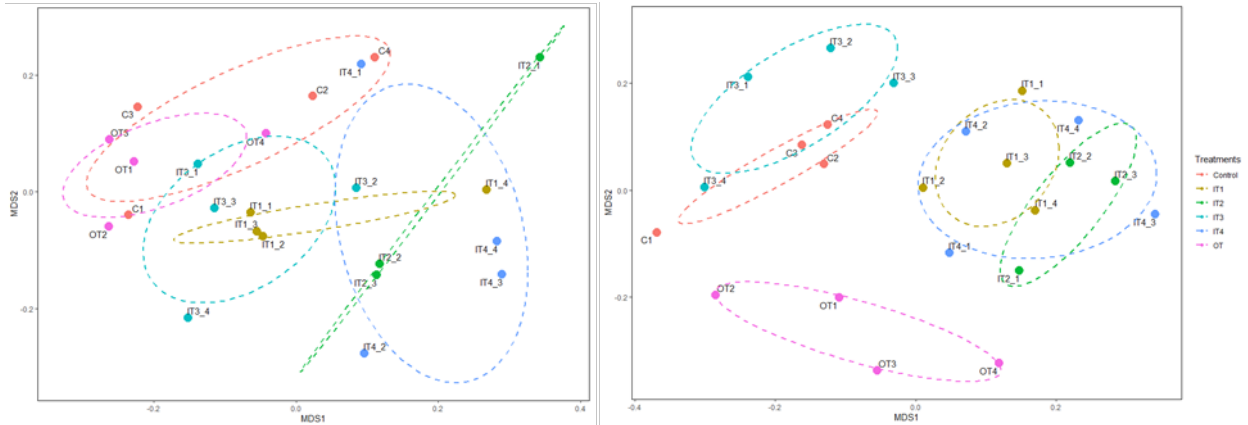


Figura 1. Análisis NMDS en una matriz de Bray-Curtis basada en los datos de ASVs de comunidades bacterianas (izquierda) y fúngicas (derecha) en diferentes tratamientos de fertilización

Tabla 1. Predicción de genes de rutas asociadas al metabolismo del nitrógeno encontradas en diferentes tratamientos de fertilización. Los datos muestran la media y desviación estándar. Valores en una misma columna con diferente letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según test de Tukey HSD.

Treatment	Denitrification							Nitrification			
	<i>narG</i>	<i>narH</i>	<i>narI</i>	<i>nirK</i>	<i>norB</i>	<i>norC</i>	<i>nosZ</i>	<i>amoA</i>	<i>amoB</i>	<i>amoC</i>	<i>hao</i>
Control	0.95±0.11	0.11±0.01	0.51±0.08	0.66±0.07a	0.96±0.03bc	0.20±0.03	0.96±0.16	0.12±0.05a	0.12±0.05a	0.22±0.09a	0.45±0.07
IT1	0.98±0.07	0.11±0.01	0.55±0.08	0.71±0.03ab	0.92±0.09abc	0.18±0.02	0.93±0.05	0.27±0.07ab	0.27±0.07ab	0.49±0.14ab	0.44±0.03
IT2	0.85±0.21	0.10±0.02	0.49±0.01	0.83±0.10c	0.84±0.06a	0.21±0.04	1.13±0.36	0.22±0.03ab	0.22±0.03ab	0.39±0.05ab	0.37±0.10
IT3	0.92±0.07	0.11±0.01	0.50±0.05	0.74±0.06abc	0.95±0.04abc	0.21±0.06	1.01±0.06	0.35±0.09b	0.35±0.09b	0.63±0.16b	0.44±0.02
IT4	0.91±0.16	0.10±0.02	0.49±0.09	0.81±0.07bc	0.87±0.09ab	0.22±0.04	0.93±0.22	0.38±0.27b	0.38±0.27b	0.68±0.47b	0.42±0.07
OT	0.93±0.05	0.11±0.01	0.51±0.06	0.68±0.07a	0.99±0.05c	0.21±0.05	0.94±0.12	0.11±0.03a	0.11±0.03a	0.20±0.05a	0.43±0.04
ANOVA F value (P value)	0.49 (ns)	0.93 (ns)	0.26 (ns)	3.60 (0.021)	2.64 (0.05)	0.47 (ns)	0.65 (ns)	3.33 (0.028)	3.33 (0.028)	3.38 (0.026)	0.83 (ns)

Regulación de la actividad sacarolítica en plantas de pimiento en condiciones de estrés salino mediada por el portainjerto

Rootstock-mediated regulation of saccharolytic activity in pepper plants under saline stress conditions

A. Gálvez^{1*}, A. Albacete², F. M del Amor¹, J. López-Marín¹

¹Departamento de Producción Vegetal y Agrotecnología. IMIDA. C/ Mayor s/n,30150, Murcia, España.

²Departamento de Nutrición Vegetal. CEBAS-CSIC. Campus Universitario de Espinardo,30100, Murcia, España.

*1297@coitarm.es

Resumen

Los estreses abióticos alteran la actividad de las enzimas sacarolíticas que controlan las relaciones fuente-sumidero, reduciendo el transporte de sacarosa y su utilización en los órganos sumidero y afectando, al crecimiento y la productividad de los cultivos. El objetivo de este trabajo fue estudiar la modulación de la actividad sacarolítica mediada por el portainjerto en frutos de plantas de pimiento sometidas a estrés salino. Los frutos de plantas injertadas sobre el portainjerto Creonte presentaron los valores más altos de sacarosa sintasa, invertasa vacuolar y de pared celular con respecto a las otras combinaciones y las plantas sin injertar, lo que podría explicar su mayor tasa reproductiva. Además, los frutos de plantas injertadas sobre Atlante y Terrano presentaron una mayor actividad de la invertasa citoplasmática, relacionada con su mayor tasa de crecimiento. Por tanto, el portainjerto modula las relaciones fuente-sumidero en condiciones de salinidad a través del incremento de las enzimas sacarolíticas.

Palabras clave: *Capsicum annuum* L.; injerto; relaciones fuente-sumidero; enzimas sacarolíticas.

Abstract

Abiotic stresses alter the activity of saccharolytic enzymes that control source-sink relationships, reducing sucrose transport and utilization in sink organs and affecting crop growth and productivity. The objective of this work was to study the modulation of sucrolytic activity mediated by the rootstock in fruits of pepper plants subjected to salt stress. Fruits from plants grafted on the rootstock Creonte presented the highest values of sucrose synthase, vacuolar invertase and cell wall invertase with respect to the other combinations and ungrafted plants, which could explain their higher reproductive rate. In addition, fruits from plants grafted onto Atlante and Terrano presented higher cytoplasmic invertase activity, related to their higher growth rate. Therefore, the rootstock modulates source-sink relationships under salinity conditions through the increase of sucrolytic enzymes.

Keywords: *Capsicum annuum* L.; grafting; sink-source relationships; sucrolytic activities.

1. INTRODUCCIÓN

Las relaciones fuente-sumidero, que influyen en el crecimiento de las plantas y la adaptación al estrés, se ven afectadas por estreses abióticos como la salinidad y la sequía, reduciendo el crecimiento y el rendimiento de los cultivos por una disminución en el número y tamaño de los órganos sumidero. En condiciones de estrés, los órganos fuente no pueden

mantener el suministro de asimilados necesarios para apoyar los procesos competitivos de crecimiento vegetativo, llenado de estructuras reproductivas y adaptación al estrés (1). La sacarosa es sensible al estrés abiótico y es el principal carbohidrato de transporte en las plantas superiores, desde los tejidos fuente a los tejidos sumidero (2). Los carbohidratos acumulados en plantas sometidas a estrés salino juegan un papel importante en la mitigación del estrés que implica la osmoprotección, el ajuste osmótico, el almacenamiento de carbono y la eliminación de especies reactivas de oxígeno (3,4). De hecho, algunos estudios han mostrado que el papel de los azúcares en la adaptación de las plantas a la salinidad se asocia universalmente con la tolerancia a la salinidad (5,6), actuando como moléculas señalizadoras y participando también en la regulación de genes relacionados con los mecanismos de tolerancia (7,8). Las invertasas son enzimas clave para el suministro de energía a los órganos sumidero, catalizando la escisión del enlace glucosídico de la sacarosa (9) y desempeñando importantes funciones, especialmente la invertasa de pared celular, en las respuestas al estrés biótico y abiótico (10). Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido el estudio de la regulación de la actividad sacarolítica mediada por el portainjerto en frutos de plantas de pimiento sometidas a estrés salino.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal y condiciones del cultivo

Se evaluaron plantas de pimiento de la variedad comercial 'Gacela' 'F1' (Syngenta Seeds, USA) sin injertar o injertadas sobre tres portainjertos comerciales: 'Atlante' (Ramiro Arnedo, España), 'Creonte' (De Ruiter-Monsanto Seeds-Bayer Crop Science, Alemania) y 'Terrano' (Syngenta Seeds, USA). Las plantas se cultivaron individualmente en macetas de 20 L y se distribuyeron en filas en un invernadero multitúnel con una separación de 40 cm entre plantas y 100 cm entre filas. El tratamiento de salinidad se inició 15 días después del trasplante, añadiendo NaCl a la solución nutritiva Hoagland estándar hasta llegar a una concentración final de 35 mM, mientras que las plantas control se regaron con la solución nutritiva original durante todo el ensayo.

2.2 Actividad sacarolítica

Las actividades sacarolíticas se evaluaron mediante la determinación del NADH producido en una reacción enzimática acoplada utilizando sustratos/enzimas específicos según la enzima objetivo, con base en el protocolo descrito por Balibrea et al. (11) con algunas modificaciones. Brevemente, 50 mg de muestra liofilizada de fruto en crecimiento activo de pimiento recolectado 20 días después de anthesis, se resuspendieron en 1 ml de tampón de homogeneización (HEPES 200 mM, MgCl₂ 3 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 2 %, PMSF 0,1 mM, benzamidina 1 mM). El homogeneizado se mezcló durante 20 min a 4°C y se centrifugó durante 15 min a 10.500×g y 4°C. El sobrenadante se usó para la determinación de la actividad de la invertasa soluble. El precipitado se utilizó para la determinación de la actividad de la invertasa de la pared celular, lavando el extracto no soluble tres veces con agua bidestilada y resuspendiéndolo en HEPES 200 mM, MgCl₂ 3 mM, EDTA 15 mM, glicerol al 2%, PMSF 0,1 mM, PMSF 1 mM benzamidina y NaCl 1 M. El NADH se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 340 nm. Las actividades de cada una de las enzimas sacarolíticas se expresaron sobre la base del contenido en peso.

2.3 Análisis estadístico

Los valores medios de las distintas combinaciones de injertos y del tratamiento salino se compararon utilizando el test Tukey con $P \leq 0,05$, utilizando el software SPSS para Windows (Versión 25.0, SPPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En condiciones control, no se encontraron diferencias significativas en la actividad de la sacarosa sintasa, aunque los frutos de las plantas injertadas sobre Atlante alcanzaron los valores

más elevados. En condiciones de estrés salino, tampoco se observaron diferencias significativas por efecto del portainjerto en la actividad sacarosa sintasa, si bien los frutos de plantas injertadas sobre Creonte presentaron una actividad más alta (Figura 1a).

Con respecto a la invertasa de pared celular, que tiene un papel fundamental en la regulación del estrés por salinidad, en condiciones control no se observaron diferencias significativas por efecto del portainjerto. Igualmente, en condiciones salinas no se encontraron diferencias significativas por efecto del portainjerto, aunque los frutos de las plantas injertadas presentaron valores más elevados que las plantas sin injertar, destacando la actividad de invertasa de pared celular en los frutos de plantas injertadas sobre Creonte que, además, presentaron una mayor producción (12) (Figura 1b).

La actividad de la invertasa vacuolar no se vio afectada por el portainjerto en condiciones control, aunque los frutos de plantas injertadas sobre Creonte presentaron la actividad más elevada. La salinidad provocó una disminución significativa de la actividad de la invertasa vacuolar con respecto al tratamiento control, excepto en los frutos de plantas injertadas sobre Creonte, que presentaron un incremento significativo de la actividad de la invertasa vacuolar en relación a los otros tratamientos (Figura 1c). Esto podría explicar la mayor relación reproductiva/vegetativa de las plantas injertadas sobre Creonte de entre todas las combinaciones estudiadas (12).

En condiciones control, la actividad de la invertasa citoplasmática en fruto no presentó diferencias significativas por efecto del injerto, si bien los frutos de plantas injertadas sobre Atlante y Terrano presentaron los valores más altos (Figura 1d). De igual forma, en condiciones salinas, se observaron valores significativamente más altos en los frutos de las plantas injertadas sobre Atlante y Terrano (Figura 1d). Estos mayores valores en esta invertasa podrían explicar el mayor desarrollo vegetativo en las plantas injertadas sobre Terrano (12).

4. CONCLUSIONES

Este trabajo demuestra que la modulación del metabolismo de la sacarosa a través del portainjerto es fundamental en los procesos de crecimiento y desarrollo de la planta en respuesta al estrés salino, ya sea directamente o a través de interacciones con otras vías de señalización, incluidos los procesos mediados por hormonas y redox.

5. REFERENCIAS

1. Balibrea ME, Cuartero J, Bolarín MC, Pérez-Alfocea F. Sucrolytic activities during fruit development of *Lycopersicon* genotypes differing in tolerance to salinity. *Physiol Plant*. 2003;118(1):38–46.
2. Peng J, Liu J, Zhang L, Luo J, Dong H, Ma Y, et al. Effects of Soil Salinity on Sucrose Metabolism in Cotton Leaves. *PloS One*. 2016; 11(5):0156398.
3. Akhter Banu MN, Hoque MA, Watanabe-Sugimoto M, Islam MM, Uraji M, Matsuoka K, et al. Proline and glycinebetaine ameliorated NaCl stress via scavenging of hydrogen peroxide and methylglyoxal but not superoxide or nitric oxide in tobacco cultured cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010;74(10):2043–9.
4. Gupta B, Huang B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *Int J Genomics*. 2014;2014.
5. Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol*. 2008;59:651–81.
6. Rasool S, Hameed A, Azooz MM, Muneeb-U-Rehman, Siddiqi TO, Ahmad P. Salt stress: Causes, types and responses of plants. *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*. 2012;1–24.
7. Gupta AK, Kaur N. Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J Biosci*. 2005;30(5):761–76.
8. Arbona V, Marco AJ, Iglesias DJ, López-Climent MF, Talon M, Gómez-Cadenas A. Carbohydrate depletion in roots and leaves of salt-stressed potted *Citrus clementina* L. *Impreso [Internet]*. 2005;46(2):153–60.
9. Ruan YL. Sucrose metabolism: Gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annu Rev Plant Biol*. 2014;65:33–67.

10. Kawaguchi K, Takei-Hoshi R, Yoshikawa I, Nishida K, Kobayashi M, Kusano M, et al. Functional disruption of cell wall invertase inhibitor by genome editing increases sugar content of tomato fruit without decrease fruit weight. *Scientific Reports* 2021;11(1):1–12.
11. Balibrea ME, Cuartero J, Bolarín MC, Pérez-Alfocea F. Sucrolytic activities during fruit development of *Lycopersicon* genotypes differing in tolerance to salinity. *Physiol Plant*. 2003;118(1):38–46.
12. Gálvez A, Albacete A, Martínez-Andújar C, Del Amor FM, López-Marín J. Contrasting rootstock-mediated growth and yield responses in salinized pepper plants (*Capsicum annuum* L.) are associated with changes in the hormonal balance. *Int J Mol Sci*. 2021;22(7).

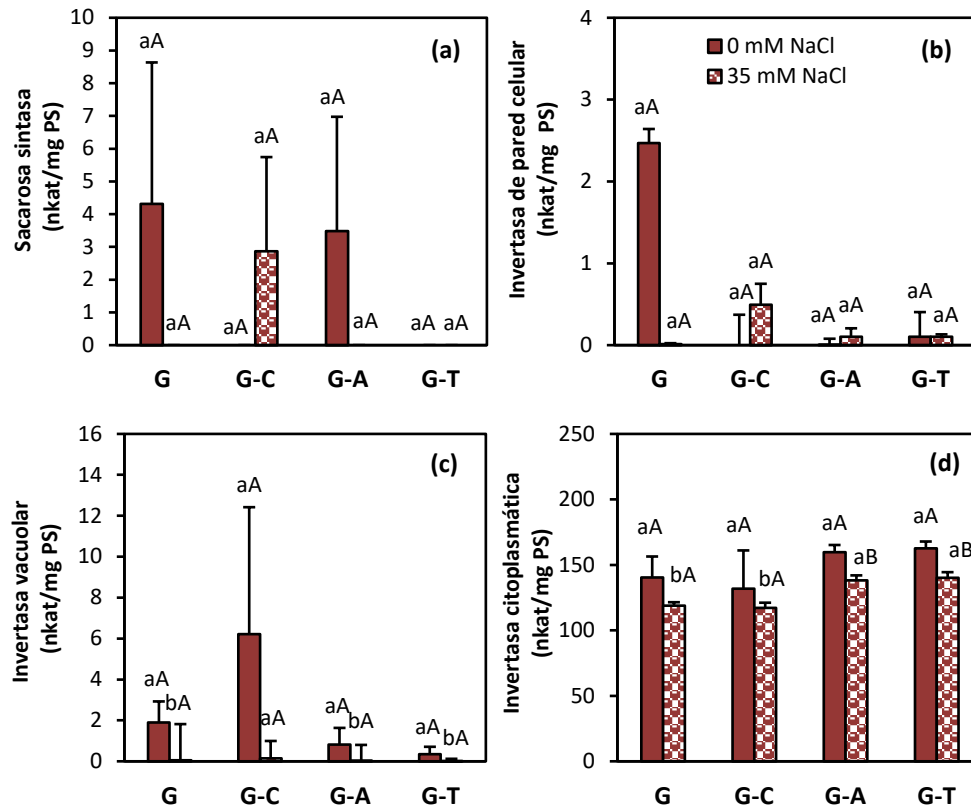


Figura 1. Invertasa (a) sacarosa sintasa, (b) de pared celular, (c) vacuolar y (d) citoplasmática en frutos de plantas de pimienta de la variedad comercial ‘Gacela F1’ no injertadas (G) o injertadas sobre tres portainjertos comerciales, Creonte (G/C), Atlante (G/A) y Terrano (G/T), y cultivadas en condiciones control (0 mM NaCl) y salinas (35 mM NaCl). Las barras muestran la media de 5 plantas \pm error estándar. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas debido al tratamiento salino, mientras que letras minúsculas diferentes muestran diferencias entre combinaciones de injerto de acuerdo con el test Tukey ($P \leq 0,05$).

Análisis estructural de las vigas del cajón interior de un lisímetro de pesada transportable

Structural analysis of the culture vessel beams of a transportable weighing lysimeter

J.A. Nicolás-Cuevas^{*1}, M. Soler-Méndez¹, D. Parras-Burgos², J.M. Molina-Martínez¹

¹Grupo de Investigación de Ingeniería Agromótica y del Mar. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203, Cartagena, Murcia. España.

²Departamento de Estructuras, Construcción y Expresión Gráfica. Universidad Politécnica de Cartagena. C/ Doctor Fleming, s/n, 30202, Cartagena, Murcia. España.

*juan.nicolas@upct.es

Resumen

En esta comunicación se estudian las vigas inferiores de apoyo del recipiente de cultivo de un lisímetro de pesada transportable para plantaciones hortícolas. El cajón de cultivo alberga el terreno reconstituido donde se desarrolla la plantación y descansa sobre un sistema de pesaje. Para asegurar el correcto funcionamiento del lisímetro el recipiente de cultivo no debe entrar en contacto con otros elementos, evitándose que sus deformaciones interfieran entre sí y modifiquen las mediciones del sistema de pesada. Se han analizado con SolidWorks Simulation los esfuerzos de las vigas y las deformaciones que experimentan. Los resultados obtenidos permiten valorar la supresión de estos elementos para reducir las dimensiones del lisímetro.

Palabras clave: Lisimetría; agricultura de precisión; elementos finitos; diseño; construcción.

Abstract

In this communication, the lower beams of the cultivation vessel of a transportable weighing lysimeter for horticultural plantations are studied. The cultivation vessel contains the reconstituted soil where the plantation is developed and rests on a weighing system. To ensure the proper functioning of the lysimeter, the cultivation container have to avoid come into contact with other elements. Its deformations could modify the measurements of the weighing system. The stresses of the beams and the deformations have been analysed with SolidWorks Simulation. The results obtained make it possible to evaluate the elimination of these elements in order to reduce the dimensions of the lysimeter.

Keywords: Lysimetry; precision agriculture; finite elements; design; construction.

1. INTRODUCCIÓN

Los lisímetros contienen una porción de suelo independizado hidrológicamente del terreno circundante, en el cual resulta posible controlar y medir los diferentes términos que intervienen en el balance hídrico (1). En los lisímetros de pesada, el incremento o pérdida de agua se mide por el cambio en la masa del recipiente en el que se encuentra el suelo. Actualmente, existen numerosos métodos y herramientas en el ámbito agronómico para determinar el peso de los cultivos que comprenden una gran variedad de modelos, funcionamiento y precios (2–4).

En la presente comunicación, se exponen la modelización y análisis estructural de la viga del cajón interior de un lisímetro de pesada transportable.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El recipiente de cultivo está formado por dos conjuntos de elementos: unas chapas plegadas y unas vigas horizontales (Fig. 1). El recipiente de cultivo transmite las cargas al sistema de pesada a través de las vigas de apoyo soldadas en su base. A continuación, se describe el modelo analizado en SolidWorks Simulation.

2.1 Pieza a estudiar y definición del modelo

La viga está formada por un perfil hueco cuadrado de 500 mm de longitud, 40 mm de lado y 2 mm de espesor, con dos taladros en la base de 9 mm de diámetro situados a 31,5 mm de los extremos. El material es acero inoxidable AISI 316. Se ha considerado un peso del cajón metálico de 37,5 kg (0,37 kN). Este peso incluye el de las dos vigas, que es de 1,17 kg para cada una.

El peso del cajón lleno de tierra es de 420,82 kg (4,13 kN). Para ello se ha considerado una densidad húmeda para terrenos del tipo arena densa de 2,12 T/m³ (20,79 kN/m³). El peso total del cajón metálico y de la tierra de cultivo es de 4,95 kN (458,32 kg).

Las tierras extraídas para la instalación del lisímetro se utilizarán como tierra de cultivo con la que se rellenará el cajón interior. Se trata de un terreno con una densidad húmeda entre una arcilla semicompacta y una arena densa, de valores comprendidos entre 1,92 y 2,12 T/m³ respectivamente. De forma conservadora, se ha optado por este último valor.

2.2 Cargas y condiciones de contorno

Esta carga total de 4,95 kN se ha dividido entre dos, obteniendo un valor de 2,25 kN, ya que la mitad de la misma será transferida a cada viga y de ahí a la estructura portante inferior. Esta carga de 2,25 kN, actuando sobre todo la cara superior del elemento, es la que se ha introducido en SolidWorks Simulation.

Para establecer las condiciones de contorno se ha considerado que esta carga se transmite al esqueleto inferior a través de cuatro puntos, que permiten el giro de la viga, pero impiden los desplazamientos horizontales y verticales. De ahí que se hayan modelizado como apoyos articulados.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos (Fig.2) indican que la viga tiene tensiones equivalentes de Von Mises muy bajas, excepto en los apoyos que experimentan una concentración de tensiones, al transferirse de forma puntual al elemento inferior. Este apoyo puntual se podría modelizar de forma más precisa teniendo en cuenta que debajo apoya sobre un cilindro del que sobresale el vástago que se introduce en el taladro realizado en la viga. Las deformaciones obtenidas son también muy pequeñas, siendo la máxima en el centro de la viga de 0,17 mm.

4. CONCLUSIONES

Las reducidas deformaciones de la viga permiten valorar la supresión de estos elementos para reducir las dimensiones del lisímetro y facilitar su instalación y transportabilidad, sin afectar a la precisión en la cuantificación de la evapotranspiración.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo recibido del Grupo de Investigación de Ingeniería Agromótica y del Mar Universidad Politécnica de Cartagena.

6. REFERENCIAS

1. Allen RG. Evapotranspiración del cultivo: guías para la determinación de los requerimientos de agua de los cultivos. FAO; 2006. (Estudio FAO riego y drenaje).
2. Meissner R, Rupp H, Seyfarth M. Advanced Technologies in Lysimetry. In: Mueller L, Saporov A, Lischeid G,

editors. Novel Measurement and Assessment Tools for Monitoring and Management of Land and Water Resources in Agricultural Landscapes of Central Asia. Cham: Springer International Publishing; 2014. p. 159–73.

3. Meissner R, Rupp H, Weller U, Vogel HJ, Manfred S. Lysimeter research in Europe-technological developments and research strategies. 19th World Congr Soil Sci Soil Solut a Chang World. 2010;(August):40–3.
4. González-Esquivá JM, García-Mateos G, Escarabajal-Henarejos D, Hernández-Hernández JL, Ruiz-Canales A, Molina-Martínez JM. A new model for water balance estimation on lettuce crops using effective diameter obtained with image analysis. Agric Water Manag. 2017;183:116–22.



Figura 1. Vigas de apoyo del recipiente de cultivo.

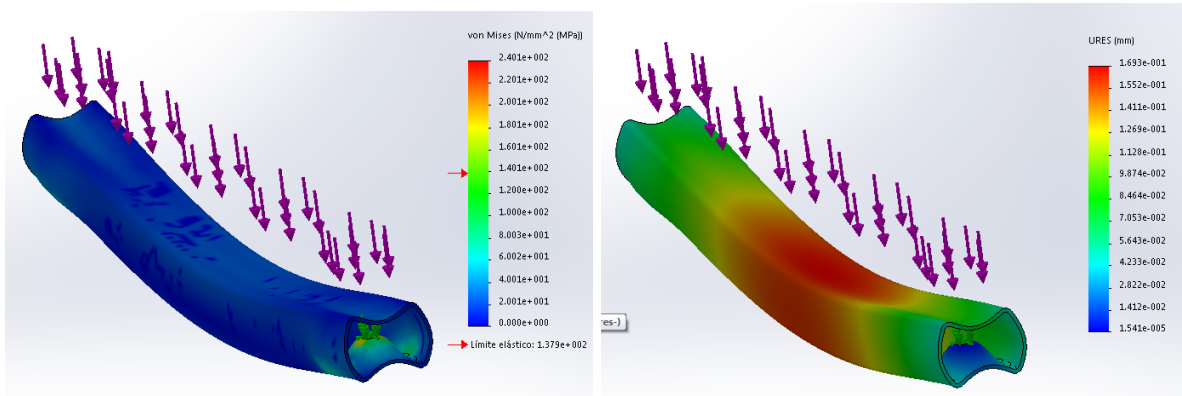


Figura 2. Tensiones equivalentes de Von Mises (MPa) y desplazamientos verticales (mm).

Efecto de biofertilizantes microbianos sobre la fertilidad biológica del suelo y el rendimiento del melón en el sur de España

Effect of microbial biofertilizers on biological soil fertility and melon yield in Southern Spain

I. Ollio*, S. Martínez-Martínez, R. Zornoza, C. Egea-Gilabert, J.A Fernández

Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

*irene.ollo@upct.es

Resumen

Los cultivos del sureste de España se ven amenazados principalmente por: a) la baja disponibilidad de nutrientes; b) la necesidad de añadir continuamente insumos externos. Las prácticas actuales de gestión de los cultivos no están optimizadas para maximizar el desarrollo de los organismos del suelo. Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de nuevos productos, basados en formulaciones de microorganismos promotores del crecimiento vegetal, sobre las poblaciones microbianas del suelo y el rendimiento y calidad de un cultivo de melón, con el fin de reducir el uso de fertilizantes de síntesis y promover el desarrollo de prácticas medioambientalmente sostenibles. En relación a los resultados obtenidos, se puede concluir que el uso combinado de fertilizantes minerales y biofertilizantes parece ser un enfoque prometedor para la reducción de fertilizantes sintéticos, sentando las bases para futuras investigaciones para evaluar el uso de tales biofertilizantes microbianos en diferentes condiciones de cultivo, de modo que pueda haber una aplicación efectiva en el agroecosistema.

Palabras clave: Melón; biofertilizantes; PGPR.

Abstract

Crops in southeast Spain are mainly threatened by: a) low nutrient availability; b) the need to continuously add external inputs. Current crop management practices are not optimised to maximise the development of soil organisms. Therefore, the aim of this work was to study the effect of new products, based on plant growth-promoting microorganism formulations, on soil microbial populations and the yield and quality of a melon crop, in order to reduce the use of synthetic fertilisers and to promote the development of environmentally sustainable practices. In relation to the results obtained, it can be concluded that the combined use of mineral fertilisers and biofertilisers appears to be a promising approach for the reduction of synthetic fertilisers, laying the foundations for future research to evaluate the use of such microbial biofertilisers in different growing conditions, so that there can be an effective application in the agroecosystem.

Keywords: Melon crop; PGPRs; biofertilisers.

1. INTRODUCCIÓN

El melón Piel de Sapo, es una variedad típica del sur de España muy consumida y apreciada. España es líder europeo en producción y exportación, así como de amplio consumo en el periodo estival. Por tanto, este trabajo experimental pretende maximizar el rendimiento de la producción de melón Piel de Sapo salvaguardando la fertilidad inherente del suelo mediante la aplicación de prácticas sostenibles como el uso de biofertilizantes microbianos.

Diseñamos un experimento comparando el uso de fertilizantes inorgánicos en un cultivo de melón con el uso de dos tipos de biofertilizantes, bacterias y bacterias+hongos asociados a una disminución del 50% en la tasa de fertilización inorgánica. El objetivo era evaluar si la fertilización mineral puede ser parcialmente remplazada por microorganismos y comprobar su efecto en la salud del suelo y el rendimiento de los cultivos. Se consideró oportuno evaluar los principales indicadores bioquímicos del suelo relacionados con actividades enzimáticas del ciclo del nitrógeno (actividad ureasa); la presencia y descomposición de pesticidas, si están presentes en el suelo (actividad arilesterasa); y la degradación de la materia orgánica vegetal (actividad betaglicosidasa y celulasa). Se evaluó si el uso de biofertilizantes puede modificar la abundancia de microorganismos del suelo, la estructura de la comunidad microbiana del suelo un cultivo de melón en comparación con un cultivo fertilizado sólo con fertilizantes inorgánicos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se llevó a cabo en Cartagena, Sureste de España, en la Finca Experimental Tomás Ferro de la Universidad Politécnica de Cartagena (37°41'16.6 "N 0°56'55.6 "W) (37° 41` N; 0° 57` E). El experimento se realizó sobre un cultivo de melón (*Cucumis melo* cv. Paredes F1, tipo Piel de sapo), cultivado desde el 29/03/2022 hasta el 5-14/07/2022. La fertilización inorgánica en CONTROL 100% consistió en 157 kg ha⁻¹ de N, 75 kg ha⁻¹ de P₂O₅ y 250 kg ha⁻¹ de K₂O aplicados por fertirrigación durante toda la vida del cultivo (1). Los otros tratamientos: i) CONTROL 50%; ii) NUVE (aplicación de bacteria y hongos) y iii) BACTONECO (aplicación bacteria) recibieron el 50% de reducción de la dosis aplicada al CONTROL 100%. Se pesaron cada unidad de melón recolectada, se analizó la producción en termino de kg ha⁻¹ y el grado Brix usando un refractómetro. La actividad arilesterasa (Aryl) se determinó según (2). La actividad celulasa (Cls) se evaluó mediante la determinación de(3,4). La actividad ureasa (Urs) (5). Todos los análisis se expresan en peso seco al aire. Se utilizó el análisis de PCR cuantitativa (qPCR) para cuantificar el número de copias de los genes 16S (segmento V3 del ARNr bacteriano) e ITS (espaciador transcrito interno en hongos). Las comparaciones se realizaron con el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de pruebas post-hoc, (HSD) de Tukey.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encontraron diferencias significativas en el peso de los melones cosechados en las distintas parcelas de tratamiento (Tabla 1). Los análisis enzimáticos, realizados en las 3 muestras de suelo recogidas en marzo, abril y mayo, muestran diferencias significativas entre las distintas parcelas de suelo en cada época de muestreo. En los análisis de ureasa las parcelas NUVE presentan una actividad muy baja en marzo en comparación con los Controles 50% y 100%, diferencias que dejan de ser significativas en abril y mayo donde la actividad enzimática se sitúa en valores similares entre todas las parcelas (Figura 1). La actividad celulasa en marzo muestra diferencias significativas sólo para las parcelas con BACTONECO respecto al resto de las investigadas; en abril se encuentra diferencias significativas en las parcelas con NUVE respecto a las parcelas con BACTONECO y CONTROL 50% y una diferencia no significativa, pero aún relevante, con CONTROL 100%. En mayo se observa un desplome de la actividad enzimática respecto a los meses anteriores para todas las parcelas investigadas, manteniéndose en niveles significativos para BACTONECO y NUVE frente a las afines CONTROL50% y CONTROL 100%. En cuanto a la actividad β-glucosidasa, hubo una diferencia significativa en marzo en CONTROL 100% en comparación con todas las parcelas investigadas. Por último, la actividad enzimática de la Arilesterasa se encuentra continua y poco variable en el suelo que se sitúa siempre por encima de

60 μmoles de p-nitrofenol $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ para todas las parcelas examinadas. Mediante PCR cuantitativa se analizó la abundancia de los genes 16S e ITS para cuantificar la abundancia de las poblaciones bacterianas y fúngicas y se determinó el ratio F:B (Tabla 2). Según los análisis qPCR de los genes 16S e ITS, la proporción entre hongos y bacterias varió en marzo dentro un rango de 0,22 y 0,04; 0,76 y 0,19 en abril; y dentro de 2,16 y 1,33 en mayo. En marzo y abril hay dominancia bacteriana sobre la fúngica, pero en mayo, en los tratamientos BACTONECO y CONTROL al 50%, encontramos un aumento marcado de la dominancia fúngica, aunque no significativo. En el análisis ANOVA encontramos diferencias significativas en la producción, destacando como los tratamientos NUVE y BACTONECO tienen las mejores performances. En este estudio, el efecto combinado de los biofertilizantes microbianos y los fertilizantes minerales resultó mejor que el de los fertilizantes químicos por sí solos. Dado que la materia energética biológica, como los nutrientes orgánicos y el consorcio microbiano, puede proporcionar energía disponible y acelerar la multiplicación de las células de microorganismos y enzimas para mejorar su entorno vital y aumentar su composición y actividad microbiana y enzimática del suelo (6). Por último, Queiroga et al. (2020) en experimentos mostraron que la aplicación de biofertilizantes en melón dio valores más altos en términos de peso, número de frutos por planta y rendimiento en comparación con el tratamiento de control sin biofertilizantes (7).

4. CONCLUSIONES

Los resultados globales pusieron de relieve que la adopción de nuevas prácticas de gestión agrícola, como el uso de biofertilizantes, parece ser un enfoque prometedor para reducir el uso de fertilizantes minerales manteniendo o aumentando el rendimiento de los cultivos agrícolas. No obstante, deberían combinarse diversas prácticas para lograr un efecto de mitigación más contrastado con los cambios en el sistema agroalimentario. Este estudio es un punto de partida para futuras investigaciones dirigidas a evaluar el uso de estos biofertilizantes en diferentes condiciones de cultivo para una aplicación efectiva en el agroecosistema. Se necesitan más investigación y apoyo público para desarrollar plenamente el potencial de los biofertilizantes microbianos mediante un conocimiento adaptativo entre investigadores, agricultores y otras partes interesadas.

5. AGRADECIMIENTOS

Los resultados de este trabajo son parte del proyecto SoildiverAgro que se financia a través del Programa Horizon 2020 de la Unión Europea para la investigación y la innovación. Grant agreement No 817819.

6. REFERENCIAS

1. CARM. Normativa Reguladora, Producción Integrada, Alimentos sanos y garantizados [Regulatory rules, integrated production, healthy food and guaranteed], Murcia, , Spain: Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia. 1998.
2. Zornoza R, Landi L, Nannipieri P, Renella G. A protocol for the assay of arylesterase activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 2009 Mar;41(3):659–62.
3. Garcia-Alvarez A, Ibañez JJ. Seasonal fluctuations and crop influence on microbiota and enzyme activity in fully developed soils of central Spain. *Arid Soil Research and Rehabilitation*. 1994 Apr 1;8(2):161–78.
4. Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*. 1944 May; 153(2):375-80.
5. Nannipieri P, Johnson RL, Paul EA. Criteria for measurement of microbial growth and activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry* [Internet]. 1978 Jan 1 [cited 2022 Apr 25];10(3):223–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0038071778901001>
6. Ancheng L, Xi S. Effect of organic manure on the biological activities associated with insoluble phosphorus release in a blue purple paddy soil. 1994 Aug 1.

7. Queiroga RCF de, Silva ZL da, Oliveira de OH, Santos E da N, Silva HLO, da Costa FB, de Assis LE. Melon fruit yield and quality as a function of doses and times of biostimulant application. RSD [Internet] 2020May3;9(7):e130973911. Available from: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/3911>

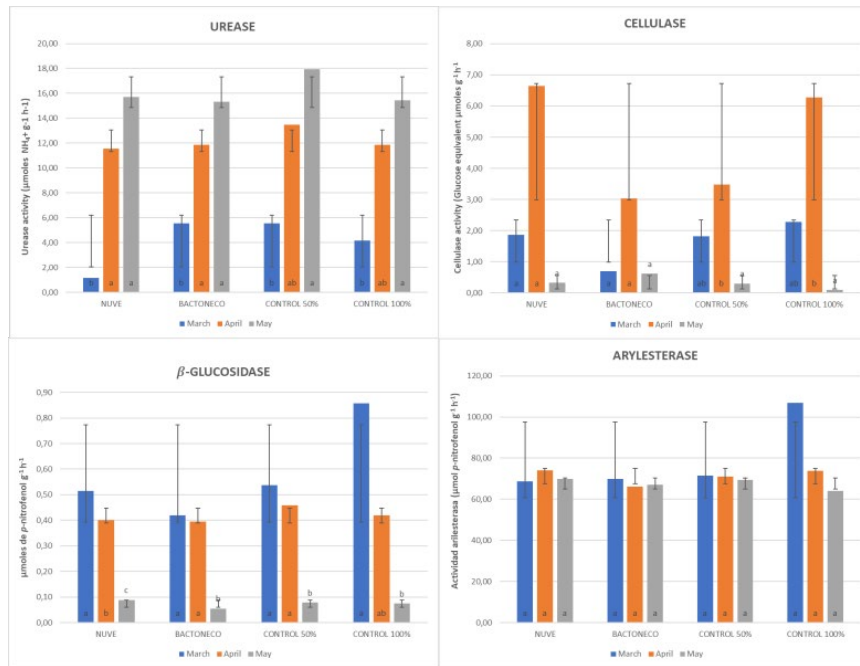


Figura 1. Análisis enzimático. ANOVA test, post-hoc Tukey HSD. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 1. Producción y calidad de melón en los cuatro tratamientos.

Tratamiento	Peso promedio Kg/unidad	Núm. Melón /m ²	Producción Tn/ha	°Brix
BACTONECO	3,74 ± 0,90 a	0,89 ± 0,1 a	33,42 ± 2,97 a	12,88 ± 0,47 ab
NUVE	3,73 ± 0,89 a	0,88 ± 0,1 a	32,67 ± 2,02 a	12,09 ± 0,9 b
CONTROL 50%	3,52 ± 0,85 b	0,87 ± 0,15 a	30,81 ± 3,11 b	13,04 ± 0,55 ab
CONTROL 100%	3,65 ± 0,89 ab	0,90 ± 0,25 a	32,97 ± 3,72 ab	13,53 ± 0,59 a
F- ANOVA	5,97 **	1,32 ns	5,97**	3,40*

ANOVA test, post-hoc Tukey HSD. Letras diferentes, en cada columna, indican diferencias significativas ($p < 0,05$). * ($p < 0,05$); *** ($p < 0,001$)

Tabla 2. Proporción hongos:bacterias (F:B) determinada por qPCR de los genes genes 16S e ITS de las muestras de suelo recogidas en marzo y mayo.

F:B ratio	March	April	May
BACTONECO	0,04 b	0,19 b	2,16 a
CONTROL 100%	0,22 a	0,41 ab	0,65 a
CONTROL 50%	0,05 b	0,76 a	1,33 a
NUVE	0,08 b	0,32 ab	0,73 a
- ANOVA	10,01***	1,382*	0,744 ns

ANOVA test, post-hoc Tukey HSD. Letras diferentes, en cada columna, indican diferencias significativas. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$)

Estrategia fisiológica dual en plantas de cebolla (*Allium cepa*) a la salinidad en regiones áridas y semiáridas

Dual physiological strategy in onion plants (*Allium cepa*) to salinity in arid and semi-arid regions

J.A. Berna Sicilia^{1*}, A. Solouki², A. Martínez-Alonso³, N. Ortiz-Delvasto, G. Barzana³ y M. Carvajal³

¹Cebollas Javaloyes. Camino La Pinara y Lo Gil S/N. 30009. Cox, Alicante, España.

²Departamento de Horticultura, Facultad de Aburairhan, Universidad de Teherán, Teherán, Irán.

³Grupo de las acuaporinas. Departamento de Nutrición Vegetal, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), Campus Universitario de Espinardo, Edificio 25, 30100. Murcia, España.

*tecnico@cebollasjavaloyes.com

Resumen

La salinidad es uno de los principales problemas ambientales que afecta al crecimiento y productividad de los cultivos. El objetivo del presente trabajo es relacionar los cambios en la expresión de diferentes genes de acuaporinas PIP2, PIP1 y TIP2 de *Allium cepa* L. frente a diferentes concentraciones de NaCl (25,50,75 y 100 mM) como mecanismos de adaptación fisiológica frente al estrés. Los resultados mostraron una estrategia dual, en primera instancia una disminución significativa del crecimiento de hojas, raíces y bulbos con concentraciones entre 25-50 mM. Sin embargo, a 75 mM se detectó un aumento de clorofila A (fotosíntesis) y una activación de la PIP2 que se relacionó con la captación de Zn, dando como resultado el aumento en peso de las cebollas.

Palabras clave: Aquaporinas; cebolla; estrés salino; PIP; TIP.

Abstract

Salinity is one of the main environmental problems that affects the growth and productivity of crops. The objective of this work is to relate the changes in the expression of different PIP2, PIP1 and TIP2 *Allium cepa* L. aquaporin genes against different concentrations of NaCl (25,50,75 and 100 mM) as mechanisms of physiological adaptation to a stressful environment. The results showed a dual strategy, in the first instance a significant decrease in the growth of leaves, roots and bulbs with concentrations between 25-50 mM. However, at 75 mM an increase in chlorophyll A (photosynthesis) and an activation of PIP2 was detected, which was related to the uptake of Zn, resulting in the increase in weight of the onions.

Palabras clave: Aquaporins; onion; salt stress; PIP; TIP.

1. INTRODUCCIÓN

La acumulación de iones de sal en el suelo, especialmente en regiones áridas y semiáridas, limita el rendimiento y la productividad de los cultivos (1). La salinidad reduce el crecimiento de las plantas debido a la disminución de la absorción de agua por el efecto osmótico, la acumulación de iones a concentraciones potencialmente tóxicas o al desequilibrio nutricional causado por la competencia entre el NaCl y los nutrientes (2). Asimismo, la salinidad provoca alteraciones en los procesos fisiológicos y metabólicos en las diferentes etapas de crecimiento de las plantas, siendo el control sobre el movimiento de agua y nutrientes un factor clave de aclimatación al estrés salino (3). En este sentido, se ha demostrado que las acuaporinas están directamente implicadas en el

trasporte de agua, además de gases, nutrientes e iones, siendo clave en la respuesta al estrés salino en múltiples cultivos. En general, ante estrés salino, la expresión de los genes de TIPs y PIPs disminuye como mecanismo defensa y adaptación para evitar la pérdida de agua, aunque se ha observado el aumento en isoformas concretas como mecanismo para compensar la vía apoplástica reducida y el potencial osmótico elevado (4).

A pesar de la gran importancia de la cebolla a nivel mundial, la bibliografía sobre la tolerancia de la cebolla a la salinidad es escasa. Su sistema radicular poco profundo hace que las cebollas hayan sido consideradas tradicionalmente como sensibles a dicho estrés, si bien estudios recientes han encontrado diferencias entre variedades (5) siendo las de día corto en general más tolerantes. Asimismo, niveles crecientes de salinidad reducen el contenido en micronutrientes y afectan negativamente a la altura de la planta y el volumen del bulbo (6).

De acuerdo con todo lo anterior, el propósito del presente trabajo es estudiar la respuesta de *Allium cepa L.* a concentraciones crecientes de salinidad analizando determinados parámetros fisiológicos significativos como el peso, el contenido en pigmentos fotosintéticos, o la concentración de nutrientes y su posible relación con la expresión de diferentes genes de acuaporinas (PIP1, PIP2 y TIP2).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Condiciones de cultivo

El material vegetal utilizado es una variedad de ciclo intermedio identificada con el código A-13. Las plantas se enjuagaron y se esterilizaron con agua destilada con NaClO al 0,5%. Posteriormente, se transfirieron a una cámara de ambiente controlado con un ciclo 16h de luz y 8h de oscuridad, Tª de 25 y 20°C día/noche, humedad relativa de 60 - 80% y radiación de 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Las plántulas se cultivaron en contenedores de 15 L de solución de Hoagland con 10 plantas por contenedor. Se realizaron cinco tratamientos diferentes (NaCl 25, 50, 75, y 100 mM) más un testigo durante 10 días en plantas en estadio de bulbificación (66 días). Los experimentos se replicaron 3 veces.

2.2 Parámetros fisiológicos

El peso se midió mediante balanza de precisión separando raíz, hoja y bulbo. La concentración de clorofila A se calculó mediante espectrofotometría. La concentración de micronutrientes (Zn) se calculó en hojas, raíces y bulbos mediante ICP.

2.3 Análisis moleculares

Las secuencias de los genes de acuaporinas se obtuvieron de la base de datos NCBI. El ARN total se extrajo de las hojas de cebolla utilizando el kit ARN NZY (NZYTech, Lisbon, Portugal). Se midió el nivel de expresión de todos los genes a partir de 2 μl de ADNc diluido 1:10 mediante qPCR en tiempo real (QuantStudio 5 Flex) utilizando el $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ como método de estandarización.

2.4 Análisis estadístico

Se realizó un diseño al azar con 3 repeticiones experimentales y 9 muestras individuales. Se utilizó software SAS versión 9.3 y Duncan test con nivel de asignación del 0,05.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados más destacados del presente trabajo muestran una reducción en peso significativa en bulbos, hojas y raíces a 50 mM, observándose una recuperación del tamaño a 75 y 100 mM (Tabla 1). Este efecto dual dependiente de concentración no había sido anteriormente descrito. En nuestra variedad, el incremento de la clorofila A a partir de 50 mM, tienen relación con el incremento del crecimiento encontrado a niveles altos de salinidad (Tabla 1).

En cuanto a la concentración de micronutrientes existen algunos trabajos que citan el aumento de Zn, Mn o Fe a altos niveles de salinidad como consecuencia de la reducción de la biomasa(7). En nuestro trabajo, el Zn mostró un comportamiento dual, disminuyendo a concentraciones bajas y aumentando hasta niveles normales en hojas y raíces a 75 y 100 mM y en bulbos a 100 mM (Tabla 1). Dichos cambios podrían estar relacionados con la captación de agua y la expresión de las acuaporinas.

En este sentido, el análisis de acuaporinas reveló que: PIP1 no se alteró de forma significativa en hojas y bulbos, pero si en raíces, donde sufrió una caída hasta 50 mM pero presentó un aumento a 75 mM, recuperando los niveles del control. De igual modo ocurrió con PIP2, siendo significativo este incremento en bulbos, alcanzando sus valores máximos de expresión a 75 mM y manteniendo los niveles del control a 100 mM. TIP2 en hoja, raíz y bulbo se redujo progresivamente hasta salinidad de 50 mM, aumentando de nuevo a 75 mM en hojas y raíces, volviendo a reducirse a 100 mM (Fig. 2). En conjunto, la activación de acuaporinas a 75 mM está fuertemente correlacionada con la concentración de Zn y parece estar relacionada con las 2 fases de respuesta a salinidad en estas plantas: una a bajas concentraciones (25 y 50 mM) y otra a altas (75-100 mM) afectando al crecimiento, que se incrementó a partir de 75 mM (Figura 1). No se puede descartar que alguna acuaporina este implicada en el transporte de otros nutrientes ayudando a la planta a adaptarse a las condiciones de estrés salino.

4. CONCLUSIONES

El cultivar estudiado A-13 mostro una tolerancia moderada al estrés salino con una estrategia dual según la concentración de NaCl: a bajas concentraciones se observa una reducción del crecimiento relacionada con los micronutrientes. A concentraciones más altas, la expresión de PIP2 resultó en relación con la captación de Zn. Dado que la función del Zn es esencial para las células y los tejidos, su concentración en los tejidos podría ser relevante para inducir la tolerancia de las plantas de cebolla a altas concentraciones de salinidad. El hecho de que algunas acuaporinas puedan aumentar su expresión para asegurar la disponibilidad de micronutrientes bajo estrés abiótico, como se observa en nuestro trabajo, debe investigarse más a fondo. El próximo desafío será determinar el mecanismo involucrado en esta respuesta.

5. AGRADECIMIENTOS

A Cebollas Javaloyes S.L. y al CEBAS-CSIC, en especial al grupo de Aquaporinas y al grupo Enzimología y Bioremediación de Suelos y de Residuos Orgánicos.

6. REFERENCIAS

1. Ashraf M, Harris PJC. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*. 2004 Jan 1;166(1):3-16.
2. Carvajal M, Cooke DT, Clarkson DT. The lipid bilayer and aquaporins: Parallel pathways for water movement into plant cells. *Plant Growth Regul* [Internet]. 1998 [cited 2023 Apr 14];25(2):89-95. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1005918305552>
3. Martínez-Ballesta MC, Aparicio F, Pallás V, Martínez V, Carvajal M. Influence of saline stress on root hydraulic conductance and PIP expression in *Arabidopsis*. *J Plant Physiol*. 2003 Jan 1;160(6):689-97.
4. Barzana G, Rios JJ, Lopez-Zaplana A, Nicolas-Espinosa J, Yepes-Molina L, Garcia-Ibañez P, et al. Interrelations of nutrient and water transporters in plants under abiotic stress. *Physiol Plant* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2023 Apr 14];171(4):595-619. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32909634/>
5. García G, García M, Ramírez H. Comportamiento de siete cultivares de *Allium cepa* L. ante diferentes niveles de estrés salino. *Bioagro*. 2015;27(2):93-102.
6. Patel JA, Vekaria LC, Sakarvadia HL, Parmar KB, Ponkia HP. Effect of saline irrigation water on growth and yields of onion (*Allium cepa* L.) varieties. *Int J Chem Stud* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2023 Apr 14];8(4):966-9. Available from: https://www.researchgate.net/publication/343005868_Effect_of_saline_irrigation_water_on_growth_and_yields_of_onion_Allium_cepa_L_varieties

7. Ojala JC, Jarrell WM, Menge JA, Johnson EL V. Influence of Mycorrhizal Fungi on the Mineral Nutrition and Yield of Onion in Saline Soil1. *Agron J* [Internet]. 1983 Mar 1 [cited 2023 Apr 14];75(2):255–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2134/agronj1983.00021962007500020023x>

Tabla 1. Pesos frescos de raíz, hoja y bulbo, Clorofila A y contenido en Zn de raíz, hoja y bulbo

	Raíces PF (g)	Hojas PF (g)	Bulbos PF (g)	Clorofila A (mg g ⁻¹ PF)	Zn en raíces (mg Kg ⁻¹ PS)	Zn en Hojas (mg Kg ⁻¹ PS)	Zn en Bulbos (mg Kg ⁻¹ PS)
Control	10,32 ± 2,3 a	26,70 ± 6,42 a	4,87 ± 1,13 a	7,04 ± 0,74 c	233,48 ± 17,99 a	43,75 ± 6,07 a	4,87 ± 1,13 a
25 mM	7,06 ± 0,32 a	22,90 ± 6,40ab	3,84 ± 1,12ab	7,56 ± 0,72 bc	101,24 ± 41,48 b	27,94 ± 1,52 b	3,84 ± 1,12ab
50 mM	4,95 ± 0,57 b	12,96 ± 1,52 b	2,01 ± 0,28 b	9,79 ± 0,15 ab	122,60 ± 25,13 b	28,22 ± 0,36 b	2,01 ± 0,28 b
75 mM	7,29 ± 1,45 a	24,74 ± 3,11ab	7,07 ± 0,75 a	10,21 ± 0,10 a	142,12 ± 31,65ab	31,75 ± 2,51ab	7,07 ± 0,75 a
100 mM	5,95 ± 1,58ab	15,89 ± 3,88ab	5,52 ± 0,82 a	9,42 ± 0,92 ab	181,39 ± 37,64ab	43,02 ± 5,76 a	5,52 ± 0,82 a

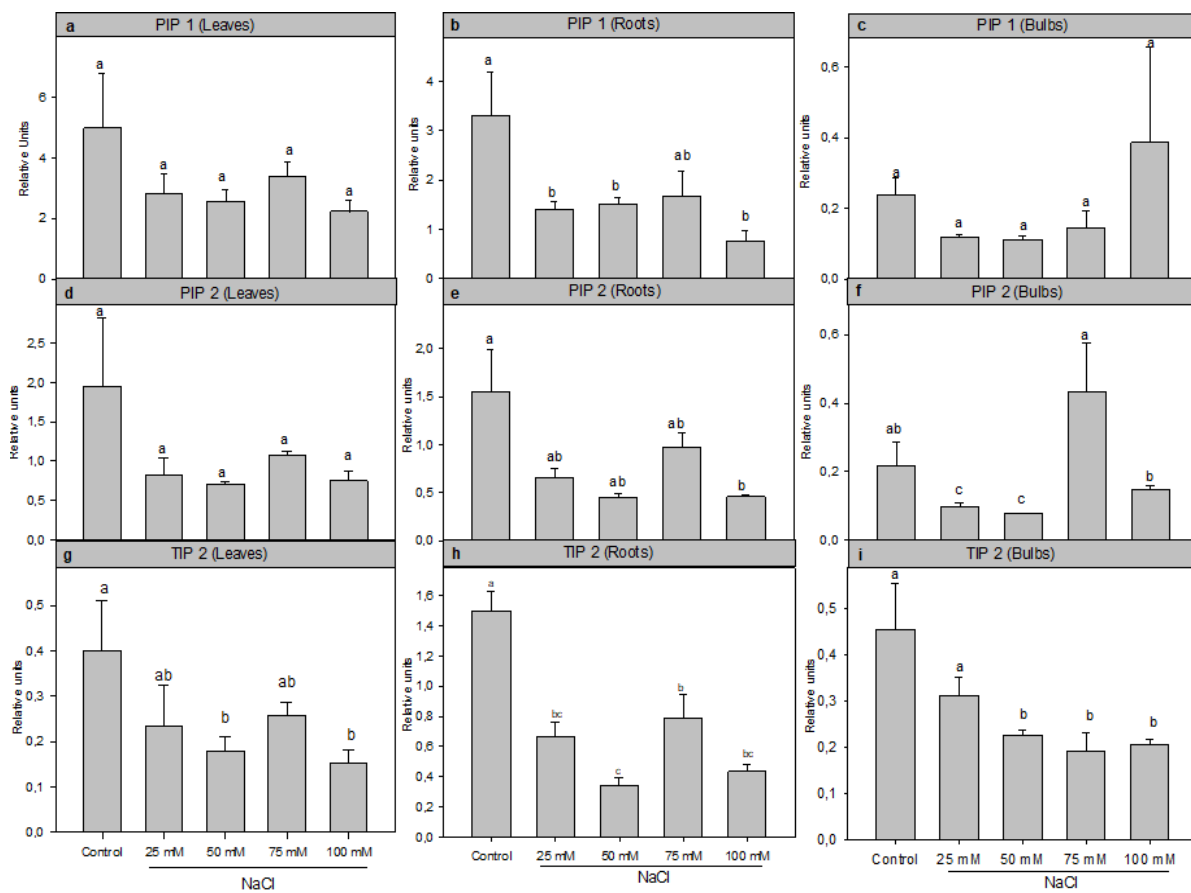


Figura 1. Expresión de niveles de acuaporinas PIP1, PIP2 y TIP2 en hoja, raíz y bulbo.

Estudio sobre el impacto de la asociación de cultivos entre brócoli y haba en la fertilidad del suelo y la producción

The effects of intercropping broccoli and fava bean on soil fertility and crop production

M. Marcos-Pérez*, V. Sánchez-Navarro, R. Zornoza

Sustainable Use, Management and Reclamation of Soil and Water Research Group. ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 52, 30203, Cartagena, Murcia España.

*mariano.marcos@upct.es

Resumen

Este estudio tuvo como objetivos evaluar si diferentes patrones de cultivo asociado entre brócoli (*Brassica oleracea var italica*) y haba (*Vicia faba*), bajo manejo orgánico, y una reducción en un 30% de fertilización, pueden mejorar la producción y la fertilidad del suelo comparado con sus respectivos monocultivos. Tras tres ciclos de cultivo desarrollados en el campo de Cartagena, los sistemas asociados incrementaron significativamente el N total, P disponible y K intercambiable (0,13%, 39 mg·kg⁻¹ y 364 mg·kg⁻¹) comparado con el monocultivo de brócoli (0,11%, 11 mg·kg⁻¹ y 277 mg·kg⁻¹). La producción total fue significativamente mayor en los cultivos asociados, con un *Land Equivalent Ratio* (LER) > 1. Por tanto, la introducción de haba asociada al brócoli es una estrategia viable de agricultura más sostenible, con beneficios ambientales y ahorro económico en fertilizantes y agua.

Palabras clave: Agricultura sostenible; asociación cultivos; fertilidad del suelo; hortalizas; leguminosas.

Abstract

The aim of this study was to evaluate whether different broccoli (*Brassica oleracea var italica*) and fava bean (*Vicia faba*) intercropping patterns can improve crop yield and soil physicochemical properties under organic management in Murcia (Spain). After three crop cycles, intercropped systems significantly increased total N, available P, and exchangeable K (0.13%, 39 mg·kg⁻¹ and 364 mg·kg⁻¹) compared to the broccoli monoculture (0.11%, 11 mg·kg⁻¹ and 277 mg·kg⁻¹). Total production was significantly higher under the diversified systems, with land equivalent ratio (LER) > 1. Thus, introducing fava bean intercropped with broccoli is a viable strategy for more sustainable agriculture, offering environmental benefits and economic savings on fertilizers and water.

Keywords: Sustainable agriculture; intercropping; soil fertility; vegetables; legumes.

1. INTRODUCCIÓN

La agricultura convencional, basada en monocultivos, ha generado problemas ambientales, como la disminución de biodiversidad, contaminación del suelo y del agua, erosión y aumento de plagas y enfermedades. La agricultura moderna busca mantener rendimientos sin impactar negativamente el medio ambiente (1). La asociación de cultivos puede mantener la producción actual y mejorar la resistencia del agroecosistema a sequías y enfermedades. Las leguminosas, como el haba, son adecuadas para la asociación de cultivos, ya que fijan nitrógeno y aumentan el rendimiento de cultivos. El objetivo de este estudio fue evaluar si la asociación de cultivos entre

brócoli y haba, en comparación con monocultivos, y con una reducción del uso de fertilizantes en un 30%, puede mejorar la producción y la calidad del suelo.

2. MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en Cartagena (Murcia), con un clima mediterráneo semiárido. Se compararon monocultivos de brócoli y haba con diferentes asociaciones de ambos a lo largo de tres ciclos de cultivo de invierno. Se estudiaron tres tipos de asociaciones: filas alternas 1:1, filas alternas 2:1 y asociación mixta. Cada sistema de cultivo tuvo tres repeticiones, distribuidas aleatoriamente en parcelas de 120 m². Se redujo un 30% la fertilización en los cultivos asociados. El muestreo del suelo se realizó a una profundidad de 0-10 cm y 10-30 cm al final del período de cosecha (marzo). Se recogieron tres muestras compuestas de cada parcela. Las muestras se secaron al aire durante 7 días, se tamizaron a <2 mm y se almacenaron a temperatura ambiente.

El C orgánico del suelo (SOC) y el N total (Nt) se determinaron utilizando un analizador elemental CHNS(O) (CHN 628, Leco). El P disponible se calculó utilizando el método de Burriel-Hernando (2) y se midió con un ICP-MS (Agilent7500CE). El NO₃⁻ se extrajo con agua desionizada en una proporción de suelo:extractante de 1:10 y se midió por cromatografía de iones (Metrohm 861).

Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para verificar la distribución normal de los datos a $P < 0.05$ y se transformaron logarítmicamente cuando fue necesario para garantizar una distribución normal. La homocedasticidad se comprobó mediante la prueba de Levene. Los datos se sometieron a un ANOVA de medidas repetidas de tres vías, con el año (2019, 2020 y 2021) como factor intrasujeto, y el tratamiento (monocultivos y cultivos asociados) y la profundidad (0-10 y 10-30 cm) como factores intersujetos. Los análisis estadísticos se realizaron en R versión 4.1.2.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El SOC no se vio afectado por la diversificación de cultivos, sin diferencias significativas entre tratamientos en la evolución a lo largo del período de tres años (Fig 1.A). Se pudo apreciar que los sistemas asociados pueden mantener los niveles de SOC, deteniendo la tendencia de disminución del contenido de SOC que se da en el monocultivo de brócoli, ya observado en otros estudios (3). El Nt mostró diferencias entre tratamientos, con valores significativamente más altos en el monocultivo de haba y en todos los sistemas de cultivo asociado, como consecuencia de la introducción de la leguminosa (Fig. 1.B). En los sistemas asociados se incrementó la disponibilidad de P, independientemente del patrón de asociación (Fig 1.C), corroborando resultados de estudios anteriores (4). La interacción entre ambas especies pudo haber activado microorganismos beneficiosos asociados a la solubilización de P. En ese sentido, Cuartero et al. (2022) estudiaron la comunidad bacteriana de las muestras de este estudio y confirmaron que los sistemas asociados aumentaron la abundancia de bacterias solubilizadoras de fosfato. El nitrato fue significativamente mayor en las parcelas con monocultivo de haba, lo que sugiere un enriquecimiento en N mineral del suelo a través de la fijación biológica de N (Fig 1.D). La falta de dicho aumento en los sistemas asociados puede indicar que algunos nitratos pueden haber sido absorbidos por las plantas de brócoli, y así, el haba contribuye a complementar parte de los requerimientos de N para el brócoli. La producción de brócoli en el cultivo mixto fue similar al monocultivo, mientras que en el intercalado en hileras fue menor debido a la menor densidad de plantas de brócoli (tabla 1). La producción de habas disminuyó en el cultivo mixto, pero no varió en intercalado en hileras en comparación con monocultivos. La producción total (brócoli+haba) fue mayor en los sistemas asociados, casi el doble en algunos casos, a pesar del uso reducido de fertilizantes y sin efectos negativos en la calidad o características nutricionales (tabla 1). Los tres patrones de asociación mostraron valores de LER (*Land Equivalent Ratio*) >1, confirmando la alta eficiencia del sistema propuesto.

4. CONCLUSIONES

La producción total, Nt y P aumentaron en el sistema asociado en comparación con el monocultivo de brócoli, independientemente del patrón de asociación. Esto demuestra la eficacia de introducir una especie de leguminosa, como el haba, en sistemas de cultivo asociados con hortalizas para mejorar la calidad del suelo y disminuir el uso de insumos externos como fertilizantes y agua.

5. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el Proyecto AsociaHortus otorgado por el Ministerio de Ciencia e Innovación de España (AGL2017-83975-R). Mariano Marcos agradece el apoyo financiero del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades de España a través del Programa "Ayudas para contratos predoctorales para la formación de doctores 2018" [PRE2018-085702].

6. REFERENCIAS

- Duhamel M, Vandenkoornhuysen P. Sustainable agriculture: Possible trajectories from mutualistic symbiosis and plant neodomestication. *Trends Plant Sci.* 2013;18(11):597–600.
- Almendo Candel M, Navarro Pedreño J, Jordán Vidal M, Gómez Lucas I. Movilidad y biodisponibilidad del fósforo en un antrosol del sureste español (Alicante) enmendado con lodo de depuradora. *Edafología.* 2003;10(1):7–14.
- Sánchez-Navarro V, Zornoza R, Faz Á, Fernández JA. Comparing legumes for use in multiple cropping to enhance soil organic carbon, soil fertility, aggregates stability and vegetables yields under semi-arid conditions. *Sci Hortic (Amsterdam) [Internet].* 2019;246(November 2018):835–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.065>
- Tang X, Zhang C, Yu Y, Shen J, van der Werf W, Zhang F. Intercropping legumes and cereals increases phosphorus use efficiency; a meta-analysis. *Plant Soil.* 2021;460(1-2):89–104.
- Cuartero J, Pascual JA, Vivo JM, Özbolat O, Sánchez-Navarro V, Egea-Cortines M, et al. A first-year melon/cowpea intercropping system improves soil nutrients and changes the soil microbial community. *Agric Ecosyst Environ.* 2022;328(June 2021).

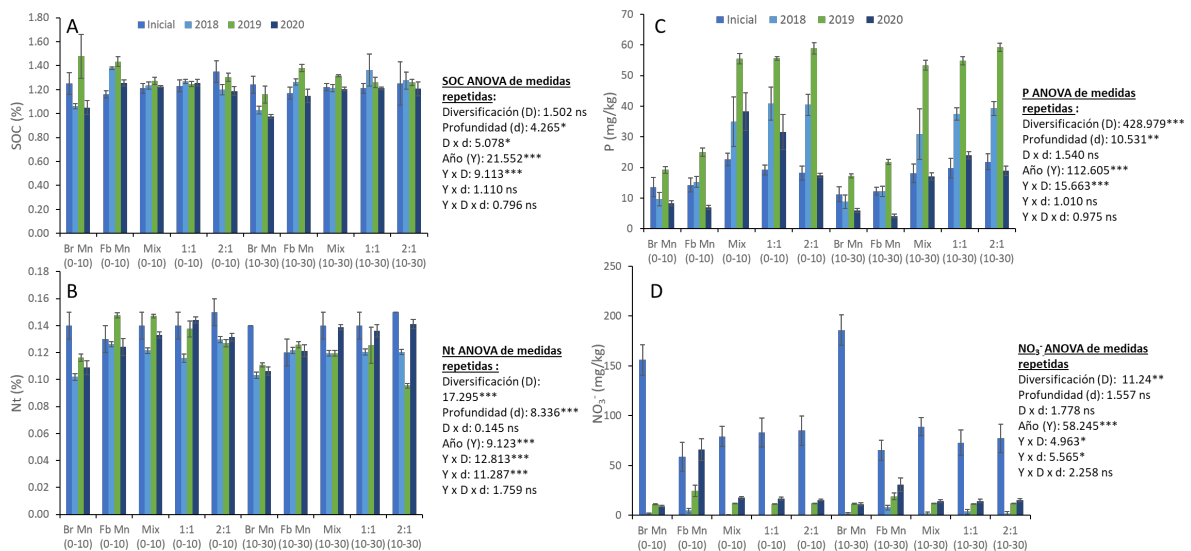


Figura 1: A) carbono orgánico del suelo (SOC), B) nitrógeno total (Nt), C) fósforo disponible (P) y D) nitrato (NO₃⁻) para las condiciones iniciales del suelo (2018) y después de tres ciclos de cultivo (2019, 2020 y 2021) en sistemas de monocultivo y asociado para dos profundidades del suelo. Br Mn: monocultivo de brócoli; Fb Mn: monocultivo de haba; Mix: asociado mixto; 1:1: asociado en filas 1:1; 2:1: asociado en filas 2:1; 0-10 y 10-30 indican la profundidad del

muestreo del suelo en cm. Las barras de error representan el error estándar (n = 5). Significativo en *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05; ns: no significativo (p > 0,05).

Tabla 1. Producción de brócoli, producción de haba, producción total y land equivalent ratio (LER) para tres ciclos de cultivo consecutivos. Los valores son la media ± el error estándar (n = 3).

	Producción de brócoli (kg·ha⁻¹)	Producción de haba (kg·ha⁻¹)	Producción total (kg·ha⁻¹)	LER
2018/2019				
Monocultivo de brócoli	19196 ± 192		19196 ± 192	
Monocultivo de haba		17857 ± 2062	17857 ± 2062	
Asociado mixto	18998 ± 645	8138 ± 347	27136 ± 795	1.44 ± 0.04
Asociado en filas 1:1	11973 ± 331	21130 ± 2041	33103 ± 1778	1.21 ± 0.04
Asociado en filas 2:1	14497 ± 850	22925 ± 2195	37422 ± 1366	1.13 ± 0.01
2019/2020				
Monocultivo de brócoli	14634 ± 1132		14634 ± 1132	
Monocultivo de haba		14643 ± 1691	14643 ± 1691	
Asociado mixto	15785 ± 683	10482 ± 690	26267 ± 598	1.67 ± 0.04
Asociado en filas 1:1	8772 ± 1330	16988 ± 1615	25760 ± 2773	1.11 ± 0.13
Asociado en filas 2:1	11187 ± 631	19056 ± 209	30242 ± 422	1.07 ± 0.03
2020/2021				
Monocultivo de brócoli	16680 ± 500		16680 ± 500	
Monocultivo de haba		10871 ± 1255	10871 ± 1255	
Asociado mixto	15228 ± 417	4865 ± 1117	20093 ± 1495	1.32 ± 0.12
Asociado en filas 1:1	11295 ± 449	13777 ± 515	25072 ± 910	1.28 ± 0.05
Asociado en filas 2:1	12270 ± 1172	16344 ± 2439	28614 ± 2319	1.15 ± 0.08
F-Valor^a				
	Factores intersujetos			
Diversificación (D)	4.494 ns	0.207 ns	60.329***	6.597*
	Factor intrasujeto			
Año (Y)	19.861***	14.470***	21.256***	0.039 ns
Y x D	0.619 ns	0.861 ns	4.302 ns	0.039 ns

^a Significativo en *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05; ns: no significativo (p > 0,05).

Mitigación del efecto del riego con agua salina sobre la actividad ureasa del suelo mediante bioestimulación

Biostimulation as a tool to mitigate the effect of saline irrigation on the soil

S. Zapata-García^{1*}, P. Berríos¹, A. Temnani¹, R. Pérez¹, P.J. Espinosa-Jiménez², A. Pérez-Pastor¹.

¹Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

²FMC Corporation, Madrid, España.

*susana.zapata@upct.es

Resumen

Debido a los escasos recursos hídricos presentes en la actualidad, se hace necesario explorar otras fuentes de agua para el riego. La salinidad es uno de los mayores problemas a los que se deben enfrentar los cultivos que utilicen un recurso hídrico de escasa calidad, mermando principalmente el rendimiento del cultivo, y a su vez, pudiendo afectar al suelo. Con el fin de atenuar ambos, en este estudio se ha realizado la aplicación de Accudo®, un bioestimulante compuesto por microorganismos. A pesar de observar un incremento significativo en la conductividad eléctrica del suelo, que causó una reducción de la actividad ureasa, la bioestimulación incrementó esta actividad enzimática, mitigando los efectos que la salinidad causó sobre el suelo y permitiendo llevar a cabo cultivos con aguas no convencionales de una forma más sostenible.

Palabras clave: *Bacillus licheniformis*; aguas no convencionales; conductividad eléctrica.

Abstract

Due to the scarce water resources present at the moment, other water resources need to be explored for irrigation. Salinity is one of the major problems that crops using this type of resources must face, mainly affecting yields, but also having an effect on soil quality. In order to mitigate both, Accudo®, a biostimulant composed of microorganisms, was applied in this study. Despite observing a significant increase in soil electrical conductivity, which caused a reduction in urease activity, biostimulation increased this enzyme activity, mitigating the effects that salinity caused on the soil and allowing crops to be grown with non-conventional water resources, in a more sustainable way.

Keywords: *Bacillus licheniformis*; non-conventional water resources; electrical conductivity.

1. INTRODUCCIÓN

La escasez hídrica casi permanente a la que se enfrenta el sudeste de España pone en riesgo la sostenibilidad de la agricultura en la zona. Esta situación ha provocado la necesidad de evaluar el uso de otras fuentes de agua, como las aguas reutilizadas, desalinizadas o subterráneas. Siendo la subterránea la más accesible para los agricultores, pero con la desventaja de presentar una conductividad eléctrica (CE) en torno a $\approx 6.5 \text{ dS m}^{-1}$, superando el umbral de tolerancia de la mayoría de los cultivos hortofrutícolas de la región. Bajo estas condiciones, la cebada, uno de los cultivos más tolerantes a la salinidad, se presenta como una alternativa viable, dado que su rendimiento comienza a disminuir en torno a 8 dS m^{-1} (FAOSTAT). Con el fin de mitigar los efectos adversos de la salinidad sobre el cultivo, diversos estudios han reportado que la aplicación de microorganismos al suelo, como *Bacillus spp.*, promueve una mayor tolerancia a las sales del

cultivo debido a la asociación de estos con la rizosfera de las plantas o por la colonización de su interior (1).

Es importante considerar que el riego con agua altamente salina no sólo puede afectar a la productividad del cultivo, sino que también tiene un efecto negativo sobre la actividad microbiológica y los procesos biogeoquímicos del suelo. Uno de los parámetros comúnmente utilizados para medir la calidad de los suelos es la actividad ureasa, una enzima involucrada en el ciclo del N, que cataliza la hidrólisis de urea a amonio, transformándolo a formas asimilables por las plantas; y se ha reportado que su actividad se encuentra afectada debido a la salinidad (2).

Por lo tanto, el objetivo de nuestro trabajo fue evaluar el efecto del riego con agua altamente salina y la bioestimulación con *Bacillus licheniformis*, sobre la producción del cultivo y la actividad de la ureasa, para disminuir la presión ejercida por el recurso hídrico y no afectar negativamente la calidad biológica del suelo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Condiciones experimentales

El ensayo se desarrolló en una parcela de 1700 m² ubicada en la Finca Experimental Tomás Ferro de la Universidad Politécnica de Cartagena (37°41'17.8"N, 0°57'00.6"W) con un cultivo de cebada (*Hordeum vulgare* L.) cv. Shakira, sembrado el 27 de enero de 2022 a una dosis de 200 kg ha⁻¹. El sistema de riego fue por goteo, compuesto por laterales de riego separadas 0,5 m entre ellas y con emisores de un caudal de 1.6 L h⁻¹, distanciados a 0,4 m sobre la lateral.

Se estableció un diseño experimental bifactorial de dos niveles (2 × 2) con $n = 3$ repeticiones por tratamiento. Los factores correspondieron a (i) Salinidad del agua de riego (S): riego con agua no salina (1,46 dS m⁻¹ y NO₃⁻ <5 mg L⁻¹) proveniente del trasvase Tajo-Segura (CTL) y riego con agua subterránea altamente salina (CE 6,5 dS m⁻¹ y NO₃⁻ 96 mg L⁻¹) (PZ); (ii) Bioestimulación (B); no tratado y bioestimulado, en que se aplicó el producto Accudo® (FMC Corporation, EEUU), compuesto por *Bacillus licheniformis* RTI-184 (3), vía riego y a una dosis de 0,5 L ha⁻¹, previo al estado fenológico de la hoja bandera (81 días después de siembra).

Los tratamientos se regaron para satisfacer el 100% de la evapotranspiración del cultivo (ET_c) según el método de FAO (4). En los tratamientos regados con agua proveniente del Trasvase Tajo-Segura se fertilizó con nitrato de amonio de manera proporcional al aporte de N del agua subterránea, para igualar las unidades fertilizantes en cada uno de ellos.

2.2 Medidas realizadas

Rendimiento. Se recolectaron dos cuadrantes de 1 m² dispuestos al azar sobre cada repetición ($n = 6$ por tratamiento) para determinar el número de espigas y granos, el peso de 1000 granos y el rendimiento como t de grano por ha. Asimismo, se recolectó una muestra compuesta de 1 kg de granos por repetición ($n = 3$ kg por tratamiento) y se determinó la distribución de calibre comercial y la capacidad germinativa (%).

CE del suelo. Cada 30 días durante el ciclo de cultivo, y a los 250 y 280 días después de siembra (DDS), se extrajeron 2 muestras de suelo por repetición ($n = 6$ por tratamiento) en el perfil de 0 a 40 cm y se determinó la CE en extracto 1:5 (p:v) con un conductímetro modelo PC80+ (XS Instruments, Italia).

Actividad ureasa. A partir de las muestras obtenidas para evaluar la CE del suelo, se extrajo una submuestra para determinar la actividad de la enzima ureasa en el suelo realizando la extracción acorde a lo descrito por Nannipieri *et al* (5), y posteriormente, determinando la concentración de amonio por colorimetría (6).

2.3 Análisis estadístico.

Se realizó un ANOVA bifactorial utilizando los factores salinidad (S) y bioestimulación (B) ($p < 0.05$), las medias se separaron mediante la prueba de Duncan ($p < 0.05$). Los análisis y la comprobación de supuestos del ANOVA se realizó mediante el software Infostat.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cantidad de agua aplicada durante el ciclo de cultivo fue de $2.092 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ (Fig. 1A). La duración del período de riego y del ciclo completo fue de 133 y 150 días, respectivamente. Los tratamientos con agua salina presentaron un mayor peso del grano y proporción de granos con calibre superior a 2,8 mm, con respecto al no salino. Sin embargo, el número de granos por espiga fue ligeramente menor, por lo que no se detectaron diferencias entre tratamientos en el rendimiento total. El rendimiento medio correspondió a $3,48 \text{ t ha}^{-1}$ y la capacidad germinativa fue en todos los casos superior al 99% (Tabla 1).

A pesar de las intensas precipitaciones ocurridas entre 30 y 60 DDS, se detectaron diferencias asociadas al factor salinidad en la $CE_{1:5}$. Estas diferencias fueron incrementándose a medida que se reanudó el riego tras las precipitaciones. La $CE_{1:5}$ máxima se observó en los tratamientos regados con agua de pozo a los 120 DDS, alcanzando valores en torno a $0,8 \text{ dS m}^{-1}$. Posteriormente y por efecto de las precipitaciones, a partir de los 250 DDS, tras el cultivo, la $CE_{1:5}$ del suelo se igualó entre tratamientos en valores en torno a $0,35 \text{ dS m}^{-1}$. El factor bioestimulante no tuvo efecto sobre la $CE_{1:5}$ del suelo durante las evaluaciones realizadas (Fig. 1B).

Respecto a la actividad ureasa (Fig. 1C), no se detectaron diferencias entre tratamientos durante el período de riego. Sin embargo, la acumulación de sales junto con la desecación del suelo previa a la cosecha, afectó a este parámetro, de forma que el tratamiento salino no bioestimulado (PZ) mostró una actividad ureasa reducida respecto al bioestimulado, tal y como ha sido advertido por otros autores (7). En concreto, los valores presentados por el tratamiento PZ+Bio, alcanzaron unos niveles similares al control, mitigando a través de la bioestimulación los efectos negativos de la aplicación de salinidad. Asimismo, la bioestimulación en condiciones no salinas (CTL+Bio), incrementó significativamente la actividad ureasa, alcanzado alrededor de dos veces la detectada en el CTL. Esta tendencia se mantuvo hasta los 250 DDS (sin cultivo). Tras las precipitaciones, la actividad ureasa se igualó entre todos los tratamientos (280 DDA), al igual que la $CE_{1:5}$ (Fig. 1A, B y C).

4. CONCLUSIONES

Incluso en cultivos con alta tolerancia a la salinidad se pueden observar efectos adversos tras la aplicación de una elevada cantidad de sales, ya que el uso de agua salina puede afectar a la calidad del suelo. En este estudio, aunque el rendimiento no se afectó negativamente, la salinidad y la desecación del suelo disminuyeron la actividad ureasa del suelo. La aplicación del bioestimulante Accudo®, permitió que estos efectos negativos sobre la actividad ureasa no se manifestasen. Estos resultados abren la puerta a incrementar la sostenibilidad de cultivos que en un futuro utilizarían recursos hídricos no convencionales.

5. AGRADECIMIENTOS

Este estudio forma parte de los trabajos realizados en el marco de la Cátedra Universitaria FMC-UPCT "Agricultural Sciences", y del convenio suscrito con Fundación 'Estrella de Levante' "6699/211A-C". Los autores quieren agradecer a L. Soria el apoyo técnico recibido.

6. REFERENCIAS

1. Lastochkina O, Aliniaiefard S, Seifikalhor M, Yuldashev R, Pusenkova L, Garipova S. Plant Growth-Promoting Bacteria: Biotic Strategy to Cope with Abiotic Stresses in Wheat. In: Wheat Production in Changing Environments. Singapore: Springer Singapore; 2019. p. 579–614.
2. Tripathi S, Chakraborty A, Chakrabarti K, Bandyopadhyay BK. Enzyme activities and microbial biomass in coastal soils of India. *Soil Biol Biochem.* 2007 Nov;39(11):2840–8.

- Safiyh Taghavi, Daniel Van Der Lelie, Jaeheon Lee. *Bacillus licheniformis* RTI184 compositions and methods of use for benefiting plant growth. WO2016108974A1, 2015.
- Allen RG, Pereira LS, Raes D, Smith M. *Crop Evapotranspiration (guidelines for computing crop water requirements)*. 1998.
- Nannipieri P, Ceccanti B, Cervelli S, Matarese E. Extraction of Phosphatase, Urease, Proteases, Organic Carbon, and Nitrogen from Soil. *Soil Science Society of America Journal*. 1980 Sep 1;44(5):1011-6.
- Kandeler E, Gerber H. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol Fertil Soils*. 1988 Mar;6(1):68-72.
- Omara AED, Hafez EM, Osman HS, Rashwan E, El-Said MAA, Alharbi K, et al. Collaborative Impact of Compost and Beneficial Rhizobacteria on Soil Properties, Physiological Attributes, and Productivity of Wheat Subjected to Deficit Irrigation in Salt Affected Soil. *Plants* 2022, Vol 11, Page 877.

Tabla 1. Parámetros productivos y calidad de grano de cebada.

Tratamiento	Rendimiento	Espigas m ⁻²	1000 granos	Capacidad germinativa	Calibre comercial > 2.8 mm
	t ha ⁻¹				
CTL	3,50 ±0,23	420,8 ±18,8	51,48 ±0,55	99,33 ±0,67	86,57 ±1,08
CTL+Bio	3,16 ±0,17	375,8 ±19,1	50,09 ±0,96	100 ±0,00	84,87 ±3,98
PZ	3,46 ±0,46	390,5 ±35,8	53,06 ±0,49	100 ±0,00	91,53 ±1,02
PZ+Bio	3,80 ±0,27	416,3 ±21,9	52,35 ±0,38	99,33 ±0,67	92,00 ±1,32
Salinidad (S)	ns	ns	**	ns	*
Bioestim. (B)	ns	ns	ns	ns	ns
SxB	ns	ns	ns	ns	ns

* Medias ± error estándar; n = 3. Letras distintas para el mismo parámetro indican diferencias significativas según la prueba de Duncan (p<0.05). *: p < 0.05; ***: p < 0.001 y ns: ANOVA no significativo.

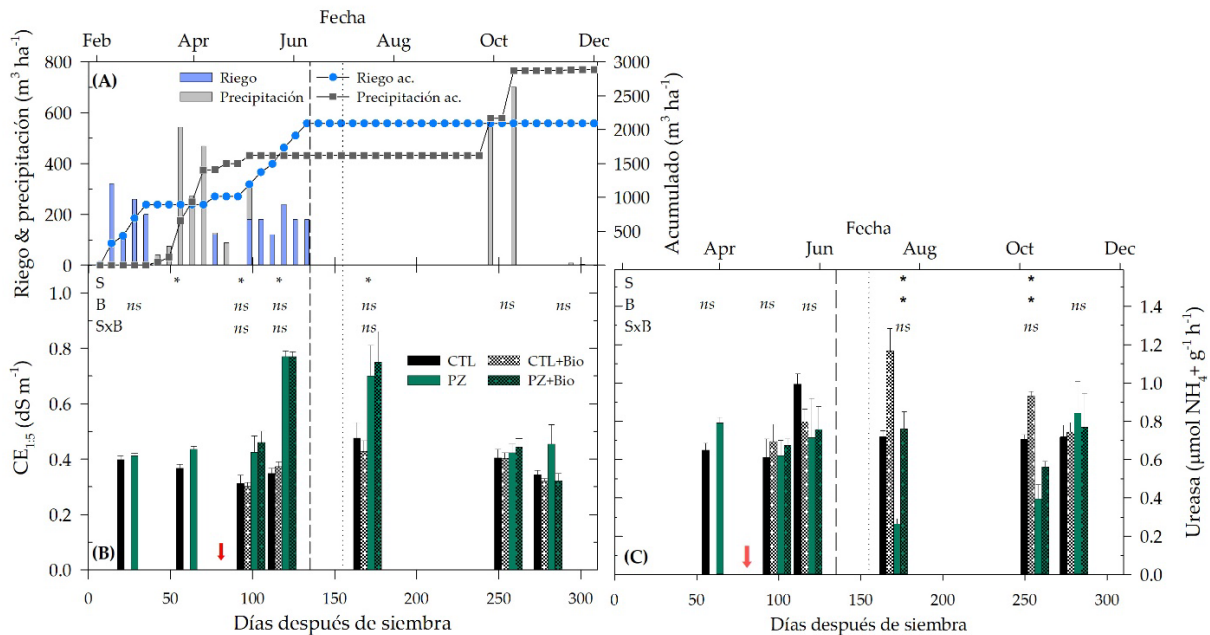


Figura 1. Evolución de (A) riego semanal y parámetros climáticos (B) CE de suelo, medida en extracto 1:5 y (C) actividad ureasa en el suelo. Líneas verticales discontinuas señala el fin de riego, líneas punteadas el día de recolección. La flecha roja indica el momento de aplicación del bioestimulante. Medias ± error estándar; n = 3. Asteriscos indican diferencias significativas entre el factor correspondiente, según Duncan (p < 0.05).

Mejora de los parámetros de calidad en frutos del género *Prunus* mediante atomización precosecha foliar de Ca, B y Si

Improvement of the quality parameters in fruits of the genus *Prunus* by means of foliar pre-harvest atomization of Ca, B and Si

F.J. Quirante-Moya^{1*}, M.C. Martínez- Ballesta², M. Carvajal-Alcaráz¹

¹ Departamento de nutrición vegetal, grupo aquaporinas del CEBAS-CSIC Campus Universitario de Espinardo. 30100, Espinardo, Murcia, España.

² Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

*quirantemoya@outlook.es

Resumen

Los frutos del género *Prunus* sp sufren un rápido deterioro de su calidad, provocando el acortamiento de su vida útil. En el transporte y comercialización de estos frutos, color y firmeza son parámetros cualitativos muy importantes. Se ha observado que algunos minerales como el Ca, B y Si están implicados en la estructura y función de la pared celular, que son vitales para mantener la firmeza. En este trabajo, se aplicaron diferentes sprays combinados (Ca, Ca + B, Ca + Si y un producto comercial llamado ANTISALGold + BREAK-Thru), se llevó a cabo en cuatro especies de *Prunus*, con la intención de comprobar si se produce una mejora en el mantenimiento de la firmeza y diferencias en el color medido durante el periodo post cosecha y en su vida útil. En general, los frutos del cultivo tratado con Ca+ Si mostraron una menor pérdida de firmeza y un tono más asociado a madurez en este periodo.

Palabras clave: Firmeza; nutrición vegetal; color; tono; vida útil.

Abstract

The fruits of the genus *Prunus* sp suffer a rapid deterioration of their quality, causing the shortening of their useful life. In the transport and marketing of these fruits, color and firmness are very important qualitative parameters. It has been observed that some minerals such as Ca, B and Si are involved in the structure and function of the cell wall, which are vital for maintaining firmness. In this work, different combined sprays were applied (Ca, Ca + B, Ca + Si and a commercial product called ANTISALGold + BREAK-Thru), it was carried out in four species of *Prunus*, with the intention of checking if there is an improvement in the maintenance of firmness and differences in the color measured during the post-harvest period and in its useful life. In general, the fruits of the crop treated with Ca+ Si showed a lower loss of firmness and a tone more associated with maturity in this period.

Keywords: Firmness; plant nutrition; color; tone; life.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Prunus* sp es, agronómicamente, uno de los géneros más importantes y en él podemos encontrar frutales de hueso como: almendras (*Prunus dulcis*), albaricoques (*Prunus*

armeniaca), cerezas (*Prunus avium* L.), nectarinas y melocotones (*Prunus persica* L.), paraguayos (*Prunus persica* L. var *platycarpa*) y ciruelas (*Prunus domestica*). En la maduración estos frutos sufren un rápido deterioro de sus propiedades físicas, bioquímicas, fisiológicas y organolépticas. Dos de los parámetros de calidad que se consideran entre los principales atributos de calidad y encuentran afectados por este proceso son la firmeza y el color (1,2).

Los sprays foliares, además de ser más respetuosos con el medio ambiente que los fertilizantes naturales, se han utilizado para conseguir una mejor absorción de nutrientes con poca disponibilidad en el suelo(3). Entre estos minerales se encuentra el Ca, el cual tiene una importancia vital en la estructura de las paredes y las membranas celulares, influyendo de manera positiva en la firmeza de los frutos de *Prunus* sp (4,5). Por otra parte, tanto B como Si juegan un rol muy importante en la formación de puentes intercatenarios en las paredes y membranas celulares (6,7). El principal objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de diferentes tratamientos minerales combinados de Ca, B y Si, (Ca, Ca + B, Ca + Si y Ag + Bt) sobre la pérdida de firmeza y la tonalidad (ángulo HUE) presentado por los frutos en su fase final de la vida útil.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los tratamientos fueron aplicados 3 veces en periodo de fructificación sobre los seis árboles centrales de la segunda. La cosecha fue en el momento comercial, se recolectaron un total de 24 frutos por bloque distribuidos en 3 réplicas técnicas equitativamente. Dado que el tiempo de vida útil es distinto para cada fruto, las medidas fueron realizadas en diferentes días tras la recolecta.

2.1 Firmeza

En cereza se midió la fuerza necesaria para causar una deformación de 5 mm en la superficie del fruto, con un analizador de texturas CT3, mientras que para el resto de frutos se midió la fuerza necesaria para penetrar 8 mm en el fruto, con una máquina de ensayo universal Ibertest.

2.2 Color

Los valores de color se tomaron tras haber salido de cámara y haber permanecido a 20° C. Para ello se utilizó un colorímetro digital Konica Minolta CR 400 para medir los parámetros A y B para hallar la tonalidad mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\text{HUE} = \text{Arctang} (B/A) * 180 / \pi$$

2.3 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos realizados fueron un Test Anova seguido de un Post-hoc con T de Student. Los softwares estadísticos utilizados fueron Microsoft office Excel y SPSS.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Pérdida de firmeza

La pérdida de firmeza varió en función del tratamiento y las características específicas de cada fruto. Las cerezas del control presentaron una pérdida de firmeza ligeramente inferior al 20% con respecto a la medida en la salida de cámara a los 14 días. A excepción del spray compuesto por Ca + Si, La influencia de los tratamientos sobre la pérdida de firmeza de los albaricoques (Fig.1B) fue similar, salvo en el tratamiento compuesto por Ca +Si cuyos frutos experimentaron una menor pérdida de firmeza que los del control. En Paraguayos (Fig.1C) los frutos del control fueron los que menor pérdida de firmeza presentaron, mientras que las muestras procedentes del cultivo tratado con AG + Bt sufrieron la mayor pérdida de firmeza. En nectarina (Fig.1D), a excepción del tratamiento compuesto por Ca, todos lograron mitigar la caída en la firmeza, observada en los frutos del control, especialmente el tratamiento compuesto por AG + Bt.

3.2 Tonalidad de color

Las cerezas procedentes de los cultivos tratados con AG + Bt y por Ca + B mostraron un aumento en el tono. En albaricoque las muestras que presentaron una tonalidad más roja fueron las procedentes del cultivo tratado con Ca + Si. Las muestras procedentes del cultivo tratado con AG + Bt presentaron un color más verdoso. En paraguay todas las muestras presentaron un tono más cercano al rojo que los del control, especialmente las procedentes del cultivo tratado con Ca + Si. Por último, en nectarina se observó que únicamente el cultivo tratado con Ca + B, presentaron una apariencia de mayor madurez. Estos resultados se hallan en concordancia con estudios anteriores, donde la aplicación precosecha de sprays compuestos por Ca, únicamente, o en combinación con otros minerales, obtuvieron una mejora en los parámetros fisiológicos de calidad de los frutos y mantenimiento de estos durante el almacenamiento (8–10).

4. CONCLUSIONES

1. La aplicación de sprays de Ca combinado con Si y también con AG + Bt favorece una menor pérdida de firmeza.

3. Los frutos obtenidos de los cultivos tratados con Ca + Si y Ca + B presentaron un color más atractivo visualmente.

4. En albaricoque la aplicación de AG + Bt favorece una menor madurez del fruto tras estar 21 días a 1º c y 5 días a 20º c.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la empresa Fénix Fresh su implicación en el proyecto y envío de frutos para su análisis.

6. REFERENCIAS

1. Valero C, Crisosto CH, Slaughter D. Relationship between nondestructive firmness measurements and commercially important ripening fruit stages for peaches, nectarines and plums. *Postharvest Biol Technol*. 2007;44(3):248–53.
2. García-Gómez BE, Salazar JA, Nicolás-Almansa M, Razi M, Rubio M, Ruiz D, et al. Molecular bases of fruit quality in prunus species: An integrated genomic, transcriptomic, and metabolic review with a breeding perspective. *Int J Mol Sci*. 2021;22(1):1–38.
3. Niu J, Liu C, Huang M, Liu K, Yan D. Effects of Foliar Fertilization: a Review of Current Status and Future Perspectives. *J Soil Sci Plant Nutr*. 2021;21(1):104–18.
4. Correia S, Queirós F, Ribeiro C, Vilela A, Aires A, Barros AI, et al. Effects of calcium and growth regulators on sweet cherry (*Prunus avium* L.) quality and sensory attributes at harvest. *Sci Hortic (Amsterdam)*. 2019;248(November 2018):231–40.
5. Dong Y, Zhi H, Wang Y. Cooperative effects of pre-harvest calcium and gibberellic acid on tissue calcium content, quality attributes, and in relation to postharvest disorders of late-maturing sweet cherry. *Sci Hortic (Amsterdam)* [Internet]. 2019;246(September 2018):123–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.10.067>
6. Sheng H, Chen S. Plant silicon-cell wall complexes: Identification, model of covalent bond formation and biofunction. *Plant Physiol Biochem* [Internet]. 2020;155(March):13–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.020>
7. Zdunek A, Pieczywek PM, Cybulska J. The primary, secondary, and structures of higher levels of pectin polysaccharides. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2021;20(1):1101–17.
8. Cui K, Shu C, Zhao H, Fan X, Cao J, Jiang W. Preharvest chitosan oligochitosan and salicylic acid treatments enhance phenol metabolism and maintain the postharvest quality of apricots (*Prunus armeniaca* L.). *Sci Hortic (Amsterdam)* [Internet]. 2020;267(March):109334. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109334>
9. Moradinezhad F, Dorostkar M. Pre-harvest Foliar Application of Calcium Chloride and Potassium Nitrate Influences Growth and Quality of Apricot (*Prunus armeniaca* L.) Fruit cv. 'Shahroudi.' *J Soil Sci Plant Nutr*. 2021;21(2):1642–52.
10. Matteo M, Zoffoli JP, Ayala M. Calcium Sprays and Crop Load Reduction Increase Fruit Quality and Postharvest Storage in Sweet Cherry (*Prunus avium* L.). *Agronomy*. 2022;12(4):829.

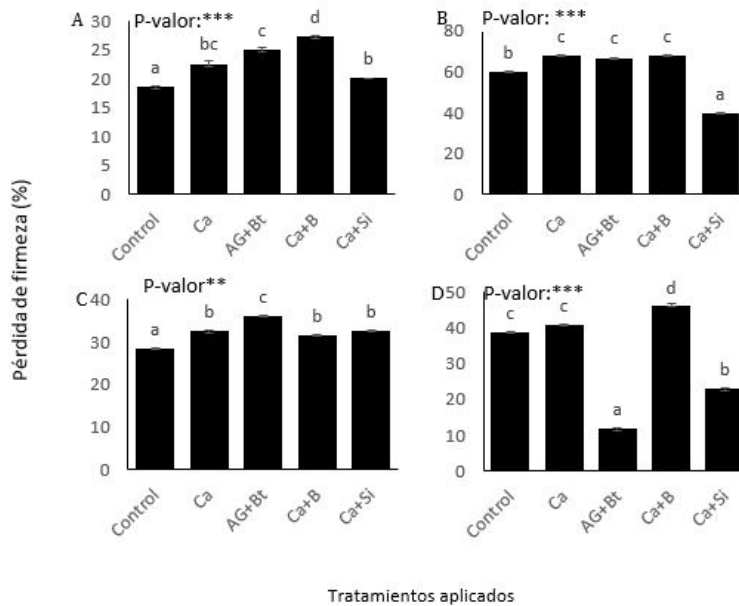


Figura 1. Pérdida de firmeza (%) frutos de *Prunus* tras la aplicación de distintos sprays foliares. Especies: A) Cereza; B) Albaricoque; C) Paraguay D) Nectarina. Tratamientos: *Control*; *Ca*; *Antisal Gold+ BEAK-Thru (AG+Bt)*, *Ca + B* y *Ca + Si*. Análisis estadístico ANOVA y Test de Duncan Post-Hoc ($\alpha=0,05$). Las diferentes letras minúsculas sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P<0,05$). Las medidas se realizaron tras 14 días a 1º c y 5 días a 20º c en cereza; 21 días a 1º c y 5 días a 20º c en albaricoque y 21 días a 1º c y 5 días a 20º c en nectarina y paraguay.

Tabla 1. Tono (HUE) de frutos de *Prunus sp* tras la aplicación de diferentes sprays foliares.

Fruto	Tratamientos					P-Valor
	Control	Ca	AG + Bt	Ca+B	Ca + Si	
Cereza	17,46±0,04b	16,49±0,05a	16,55±0,04a	19,90±0,05c	20,49±0,06c	***
Albaricoque	51,85±0,17c	49,51±0,14b	64,66±0,20d	46,66±0,29b	40,04±0,02a	***
Paraguay	74,48±0,33e	66,45±0,42d	52,60±0,23b	61,47±0,11c	47,46±0,06a	***
Nectarina	31,84±0,05b	49,85±0,22c	62,57±0,36d	25,73±0,01a	32,40±0,20b	***

Especies: A) Cereza; B) Albaricoque; C) Paraguay Tratamientos: *Control*; *Ca*; *Antisal Gold+ BEAK-Thru (AG+Bt)*, *Ca + B* y *Ca + Si*. Análisis estadístico ANOVA y Test de Duncan Post-Hoc ($\alpha=0,05$). Las diferentes letras minúsculas sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P<0,05$). Las medidas se realizaron tras 14 días a 1º c y 5 días a 20º c en cereza; 21 días a 1º c y 5 días a 20º c en albaricoque y 21 días a 1º c y 5 días a 20º c en nectarina y paraguay.

SESIÓN ORAL:
Biotecnología
Agroalimentaria

Mineralización de carbono y nitrógeno en depósitos de residuos mineros metalíferos restaurados vs. abandonados espontáneamente colonizados por la vegetación como indicador para evaluar la funcionalidad edáfica

Carbon and nitrogen mineralization in metal mine tailings technically recovered vs. abandoned spontaneously colonized by vegetation as indicator to assess soil functionality

M. Ceacero-Moreno*, J. Álvarez-Rogel, M.N González-Alcaraz

Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

*matias.ceacero@upct.es

Resumen

Los residuos mineros metalíferos se encuentran entre los ambientes más inhóspitos para la biota (altos niveles de metales/metaloides, pH extremos, alta salinidad, escasa materia orgánica y nutrientes). A menudo estos residuos se depositan en pilas al aire libre (depósitos de residuos mineros), que clásicamente son restaurados mediante técnicas de cubrición con suelo limpio y posterior plantación. Una alternativa es favorecer el crecimiento de especies vegetales sobre los residuos, contribuyendo a crear sistemas suelo-planta funcionales, como han demostrado estudios previos. El objetivo del trabajo fue evaluar cómo los suelos de depósitos técnicamente restaurados y los abandonados colonizados espontáneamente por la vegetación difieren en su capacidad para mineralizar carbono y nitrógeno. Los resultados muestran que los suelos de ambos depósitos son funcionales, y tienen un potencial similar para mineralizar nitrógeno. Sin embargo, los suelos del depósito restaurado mostraron mayor capacidad de mineralizar carbono.

Palabras clave: contaminación del suelo; minería metálica; transformación de C; transformación de N; microbiología edáfica.

Abstract

Metal mine wastes are among the most hostile environments for biota (high metal/metalloid levels, extreme pH, high salinity, low organic matter and nutrients). These wastes are often stored in open-air piles (mine tailings) that are classically restored with techniques of topsoil capping and then afforestation. An alternative is to promote the growth of native plant species directly in mine wastes, which help to create functional soil-plant systems, as previous studies showed. This work aimed to evaluate how technically reclaimed and abandoned spontaneously colonized metal(loid) mine tailings' soils differ in their ability to mineralize carbon and nitrogen. The results show that the soils of both mine tailings are functional and have a similar potential to mineralize nitrogen. However, the soils of the restored reservoir showed a greater capacity to mineralize carbon.

Keywords: soil pollution; metal mining; C transformation; N transformation; soil microbiology.

1. INTRODUCCIÓN

La minería metálica es una de las actividades humanas más perjudiciales para el medio ambiente. Entre otros, esto se debe a la gran cantidad de residuos potencialmente peligrosos que genera, muchos de los cuales se almacenan en depósitos al aire libre (depósitos de residuos mineros). Estos residuos se caracterizan por tener, muchas veces, valores de pH ácido o alcalino, alta salinidad, escaso contenido en materia orgánica y nutrientes y elevados niveles de metales/metaloideos (elementos potencialmente tóxicos, EPTs) (1). Como consecuencia, los suelos de los depósitos de residuos mineros metalíferos constituyen, generalmente, ambientes inhóspitos para la biota, lo que dificulta el crecimiento de las plantas. Los depósitos desprovistos de vegetación son propensos a ser erosionados por el viento y el agua, favoreciendo la dispersión de EPTs a las zonas circundantes, lo que supone un riesgo para el medio ambiente y la salud humana. Una técnica ingenieril clásica de restauración de los depósitos de residuos mineros consiste en encapsularlos, cubriéndolos con materiales “limpios” para crear un nuevo suelo, y posteriormente realizar una plantación. Estas actuaciones deberían priorizarse cuando los depósitos entrañen un riesgo inaceptable por colapso y/o por su cercanía a núcleos de población. Sin embargo, a causa de la gran cantidad de depósitos de residuos mineros abandonados que existen, es poco viable asumir los elevados costes económicos y las dificultades técnicas de restaurar todos ellos por métodos de encapsulado (1). Además, esta opción ha sido cuestionada en regiones áridas y semiáridas debido, sobre todo, a que el material de relleno puede no proporcionar suficientes recursos a la biota para que se desarrolle un sistema suelo-planta funcional y autosostenible a medio y largo plazo. Una alternativa es promover el crecimiento de las plantas directamente sobre los residuos mineros almacenados en los depósitos, un fenómeno que muchas veces se produce de forma natural cuando ciertas especies colonizan estos ambientes espontáneamente. Esto promueve la mejora de las condiciones fisicoquímicas y microbiológicas de los suelos de los depósitos mineros, contribuyendo a que sean funcionales, mejorando el ecosistema (2). Las técnicas que estudian estos procesos naturales y tratan de incentivarlos se engloban en lo que se conoce como fitomanejo. El fitomanejo por fitoestabilización trata de estimular la formación de sistemas suelo-planta funcionales, al tiempo que se reducen los riesgos de movilización y dispersión de EPTs, al quedar éstos estabilizados en las rizosferas. Los procesos implicados en la mineralización del carbono (C) y nitrógeno (N), claves en el ciclado de la materia orgánica, están considerados como uno de los indicadores más sensibles para establecer la funcionalidad edáfica. Así, este trabajo tuvo como objetivo evaluar cómo los suelos de los depósitos de residuos mineros metalíferos técnicamente restaurados (cubrición y plantación) y los abandonados que han sido colonizados espontáneamente por la vegetación difieren en su capacidad para mineralizar C y N, y si esto puede estar influido por el tipo de vegetación y la estación del año.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en el antiguo distrito minero de La Unión–Sierra de Cartagena (SE de España). La zona presenta un clima Mediterráneo semiárido y la vegetación natural consiste en arbustos xerofíticos y pequeñas formaciones de pino carrasco (*Pinus halepensis*). En la zona la actividad minera fue intensa hasta su cese definitivo en 1991. Actualmente existen 89 depósitos de residuos mineros metalíferos, muchos de ellos abandonados sin ningún tipo de restauración, habiendo sido algunos de ellos parcialmente colonizados por la vegetación de la zona de manera espontánea. Para este estudio se seleccionaron dos depósitos de residuos mineros: uno de ellos restaurado técnicamente por cubrición con suelo limpio y posterior plantación (R) y otro abandonado y colonizado espontáneamente por la vegetación (C). Ambos pantanos almacenan residuos similares y fueron restaurados/abandonados hace unos 40 años. En ambos se establecieron cinco parcelas (5 x 10 m²) en dos ambientes: vegetación arbustiva (especies similares en ambos depósitos) y vegetación arbórea (*P. halepensis*). Por tanto, se estudiaron cuatro ambientes: R-arbustos; R-árboles; C-arbustos; C-árboles. En invierno (principios de

febrero) y verano (finales de julio) de 2022 se recogieron muestras de suelo de todas las parcelas. En las muestras de invierno se llevó a cabo una caracterización inicial de los suelos de estudio analizando, entre otros, textura, pH, conductividad eléctrica (CE), carbono orgánico total (COT) y soluble en agua (COS), nitrógeno total (NT) y soluble (NTS), micro/macronutrientes y metales/metaloideos totales y solubles en agua, siguiendo la metodología empleada en trabajos previos realizados por el grupo de investigación (2).

Además, en las muestras recogidas en ambas estaciones se evaluó la mineralización del C y N de la materia orgánica por los microorganismos del suelo (3,4). Las muestras fueron incubadas durante 28 días a 20 °C y 50 % de capacidad de retención hídrica en oscuridad. Para la transformación del C, tras 28 días, se adicionó glucosa a las muestras de suelo y durante 12 horas se midió la tasa de respiración inducida por la glucosa (producción de C-CO₂). Para la transformación del N, antes de iniciar la incubación, se añadió alfalfa a las muestras. Tras 28 días se calculó la tasa neta de mineralización de N. Adicionalmente, en las muestras de suelo recogidas en ambas estaciones se determinó el carbono de la biomasa microbiana (CBM) y la actividad proteasa, siguiendo la metodología empleada en trabajos previos (2).

En ambos depósitos para el tratamiento estadístico de los datos se aplicó un ANOVA de dos vías, con el fin de conocer la influencia del tipo de vegetación y la estación del año.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 recoge las principales características de los suelos de estudio. Ambos depósitos mostraron textura parecida y valores de pH similares ($\approx 7,1-7,5$). En ambos las concentraciones totales de metales/metaloideos fueron muy altas (As $\approx 73-521$ mg kg⁻¹, Pb $\approx 5433-7221$ mg kg⁻¹, y Zn $\approx 3348-5784$ mg kg⁻¹; datos no mostrados). En ambos depósitos los valores neutros-básicos de pH favorecieron concentraciones bajas de metales/metaloideos extraíbles con agua (en $\mu\text{g kg}^{-1}$): As $\approx 2-10$, Pb $\approx 27-132$, y Zn $\approx 212-589$ (datos no mostrados). La CE, medida indirecta de la salinidad del suelo, fue más alta en el depósito colonizado ($\approx 0,4-0,9$ vs. $\approx 1,9-2,1$ dS m⁻¹), mientras que los contenidos de COT y NT fueron más bajos (COT $\approx 12,0-13,8$ vs. $\approx 5,4-11,7$ mg kg⁻¹ y NT $\approx 0,8-1,1$ vs. $\approx 0,3-0,6$ mg kg⁻¹), especialmente en los suelos con vegetación arbustiva.

En relación con la mineralización del C, los suelos del depósito restaurado mostraron mayores tasas de respiración inducida (C-CO₂) por glucosa que los del depósito colonizado (Figura 1A), coincidiendo con mayores niveles de CBM en el primero (en mg C kg⁻¹: R-arbustos $\approx 168-205$, R-árboles $\approx 156-234$, C-arbustos $\approx 29-33$, y C-árboles $\approx 97-104$; datos no mostrados). En este caso, cuando realizamos el ANOVA de dos vías, se obtuvo para los suelos del depósito restaurado una interacción significativa de la vegetación y la estación, mientras que en los suelos del depósito colonizado solo se observó un efecto significativo de la vegetación. En relación con la mineralización del N, en las muestras de invierno, la tasa de mineralización de N fue similar en ambos pantanos y entre ambientes (Figura 1B). Sin embargo, en las muestras de verano, ambos depósitos mostraron una tasa superior de mineralización de N en los ambientes con árboles. En este caso, no se ha encontrado un comportamiento similar entre estos datos y la actividad proteasa (uno de los enzimas limitantes en la mineralización del nitrógeno) (en $\mu\text{g Tir g}^{-1} \text{ h}^{-1}$: R-arbustos $\approx 10,0-10,8$, R-árboles $\approx 12,7-20,3$, C-arbustos $\approx 3,5-5,2$, y C-árboles $\approx 7,6-8,9$; datos no mostrados). En este caso, para los suelos de ambos depósitos se obtuvo una interacción significativa de la vegetación y la estación al realizar el ANOVA de dos vías.

4. CONCLUSIONES

Los resultados apuntan a que tanto el depósito minero restaurado como el colonizado espontáneamente por la vegetación presentan suelos funcionales, capaces de mineralizar el C y N de la materia orgánica. No obstante, existen diferencias entre ellos. El depósito restaurado, con mayor actividad microbiológica, muestra una mayor capacidad para transformar el C, influenciada por la vegetación y condicionada por la estación. Sin embargo, en el caso del N, ambos depósitos

muestran un potencial similar, influenciado por la vegetación y condicionado por la estación. Este estudio forma parte de un proyecto más amplio en el que se están analizando múltiples parámetros funcionales del suelo para comprender mejor la funcionalidad de los suelos de estos sistemas.

5. AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 (PID2020-118941RA-I00) y la UPCT (Contrato Predoctoral FPI). M.N. González-Alcaraz es investigadora Ramón y Cajal del Ministerio de Ciencia e Innovación de España (RYC2020-029322-I).

6. REFERENCIAS

1. Mendez MO, Maier RM. Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments - An emerging remediation technology. *Environ Health Perspec.* 2008; 116: 278-83.
2. Peñalver-Alcalá A, Álvarez-Rogel J, Peixoto S, Silva I, Silva ARR, González-Alcaraz MN. The relationships between functional and physicochemical soil parameters in metal(loid) mine tailings from Mediterranean semiarid areas support the value of spontaneous vegetation colonization for phytomanagement. *Ecol Eng.* 2021; 168: 106293.
3. OECD. 2000a. Guideline for the testing of chemicals. Test No.217. Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test.
4. OECD. 2000b. Guideline for the testing of chemicals. Test No.216. Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test.

Tabla 1. Caracterización inicial de los ambientes de estudio en el depósito de residuos minero restaurado (R) y colonizado espontáneamente por la vegetación (C) (media ± DE, n=5). CE=conductividad eléctrica; COT=carbono orgánico total; NT=nitrógeno total.

Parámetro	Rarbustos	Rárboles	Carbustos	Cárboles
Textura	Areno-limosa	Areno-limosa	Limo-arenosa	Limo-arenosa
pH-H ₂ O	7,4 ± 0,3 bc	7,5 ± 0,1 c	7,1 ± 0,1 a	7,2 ± 0,1 ab
CE (dS m ⁻¹)	0,9 ± 0,9 a	0,4 ± 0,3 a	2,1 ± 0,1 b	1,9 ± 0,4 b
COT (g kg ⁻¹)	13,8 ± 3,5 b	12,0 ± 2,0 b	5,4 ± 1,2 a	11,7 ± 3,3 b
NT (g kg ⁻¹)	1,1 ± 0,2 c	0,8 ± 0,2 bc	0,3 ± 0,2 a	0,6 ± 0,1 b

Letras diferentes indican diferencias significativas entre ambientes (ANOVA de un factor seguido de prueba post-hoc de Tukey, p < 0,05).

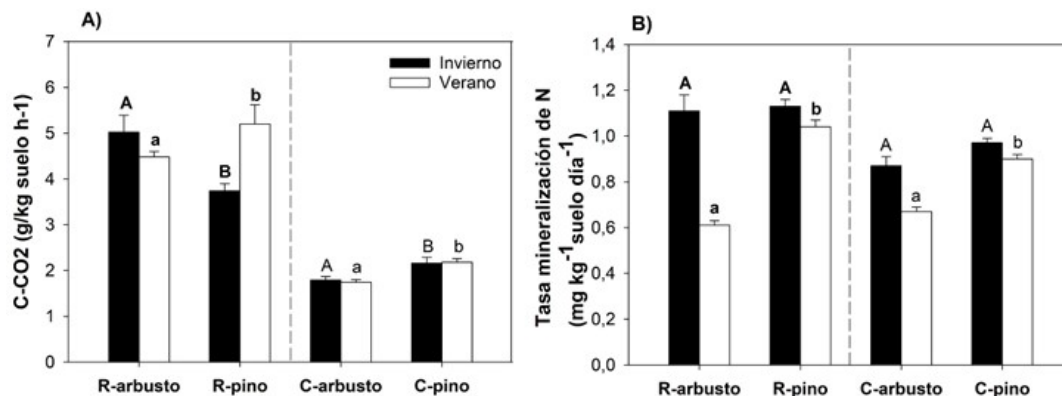


Figura 1. Tasa de respiración inducida por glucosa (A) y tasa de mineralización de N (B) tras 28 días de incubación de las muestras de suelo del depósito de residuos mineros restaurado (R) y colonizado espontáneamente por la vegetación (C). Los datos son la media ± DE (n=5). Letras diferentes (mayúsculas para invierno y minúsculas para verano) indican diferencias significativas entre ambientes (ANOVA de dos vías, p < 0,05).

Efectos del medio condicionado para reducción de estrés por cizalla y por dilución en cultivos de células vegetales

Conditioned medium effects on reducing shear and dilution stress in plant cell cultures

F. Verdú-Navarro^{1,2*}, R. Burke³, J.A. Moreno-Cid¹, M. Egea-Cortines², P. McCabe³, J. Kacprzyk³

¹Technological Development Department, Bionet, Fuente Álamo, Murcia, España

²Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Cartagena, Murcia, España

³School of Biology and Environmental Science, University College Dublin, Dublin, Irlanda

*fuensanta.verdun@edu.upct.es

Resumen

A pesar de las ventajas que presentan los cultivos de células vegetales para expresión y producción de proteínas y otros metabolitos de interés en biorreactores frente a los cultivos microbianos, tienen algunas limitaciones. Dos de las más importantes son el alto porcentaje de inóculo que se necesita para que los cultivos sean viables y el estrés por cizalla que sufren por la agitación mecánica. El estrés por dilución, o bajo porcentaje de inóculo, y el estrés por cizalla dan lugar al proceso de muerte celular programada (MCP). En estudios previos se ha visto que un medio de cultivo condicionado puede proteger a las células de la MCP. En este trabajo se ha estudiado este efecto frente al estrés por cizalla y por dilución que sufren los cultivos celulares vegetales a escala de matraz, para poder aplicarlo a cultivos en biorreactores.

Palabras clave: Biorreactor; producción proteínas; metabolitos; muerte celular programada.

Abstract

Although there are advantages about using plant cell cultures as expression system to produce proteins and metabolites of interest in bioreactors comparing to microbial cultures, they also have some limitations. Two of the most important ones are the high inoculum percentage is needed to have viable cultures and the shear stress they suffer from mechanic agitation. Both stresses lead to programming cell death (PCD). In previous studies, it has been demonstrated that a cell-conditioned growth medium has a protective effect against PCD. In this work, we have studied this effect against both stresses in flask cultures, to apply it in the future to bioreactor cultures.

Keywords: Bioreactor; protein production; metabolites; programmed cell death.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de células vegetales y su uso como sistema de expresión para producción de proteínas y metabolitos de interés ha incrementado a partir del siglo 21. Debido a ello, se ha intentado obtener el mayor rendimiento posible con estos cultivos, para sacar el máximo provecho. Este tipo de cultivos presenta ventajas frente a los cultivos que se emplean normalmente en la industria farmacéutica para la producción de proteínas recombinantes. Por ejemplo, la seguridad del producto o la capacidad de producir proteínas que requieran modificaciones post-traduccionales; con microorganismos pueden aparecer problemas de pérdida de funcionalidad en proteínas debido a que no realizan estas modificaciones, y en células de mamífero sí se podrían hacer, pero los medios de cultivo tienen un precio muy elevado. Sin

embargo, las células vegetales presentan también problemas relacionados con su cultivo en biorreactores.

Dos de los problemas más importantes son el estrés por cizalla que se genera por la agitación mecánica en biorreactores de agitación continua y el alto porcentaje de inóculo que se necesita para que el cultivo sea viable. Ambos suponen un reto a la hora del escalado de los procesos de producción, afectando a los costes y a los rendimientos.

En estudios previos se ha demostrado que en cultivos celulares vegetales muy diluidos se induce la muerte celular programada(1). Por otro lado, el estrés por cizalla causa daño celular que puede provocar la apoptosis. Pero este proceso de MCP puede inhibirse añadiendo medio condicionado(2). Este medio consiste en un medio libre de células, en el cual han crecido previamente células sanas.

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto del medio condicionado en la inhibición de la MCP en células sujetas a estrés por dilución y estrés por cizalla debido a la agitación mecánica. Los ensayos primero se realizarán a escala de matraz y posteriormente, en futuros trabajos, se harán a escala de biorreactor si la hipótesis es correcta.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cultivos vegetales

Para estos ensayos se emplearon cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* de las variedades Columbia (Col0) y Landsberg erecta (Ler).

2.2 Medio condicionado

El medio condicionado se preparó siguiendo el siguiente protocolo:

1. Filtrar un cultivo sano de *Arabidopsis thaliana* de siete días de edad crecido en oscuridad a través de una malla con un tamaño de poro de 71µm.
2. Filtrar de nuevo el cultivo a través de un filtro Whatman Grado 1 (11µm).
3. Ajustar el pH del medio a 5.8 y añadir las fitohormonas.
4. Autoclavar el medio a 121°C durante 30 minutos.

2.3 Condiciones de estrés

Las condiciones para inducir la muerte celular programada fueron:

- Estrés por dilución: Los cultivos de Col0 y Ler se subcultivaron a una tasa de dilución de 1:10 como control positivo, y a una tasa de 1:50 como control negativo. En ambos casos se añadió el medio condicionado al 20% para ver su efecto. Se realizaron recuentos cada 24 horas durante siete días.
- Estrés por cizalla: Los cultivos de Col0 con siete días de edad se sometieron a agitación con un agitador magnético durante 48 horas. Los recuentos se realizaron a las 6, 24 y 48 horas del inicio de la agitación.

2.4 Determinación viabilidad celular

Para la determinación de la viabilidad celular y el recuento de células viables, en proceso de muerte celular programada o necróticas, se recurrió al método de tinción mediante diacetato de fluoresceína. El recuento se hizo con la ayuda de un microscopio con fluorescencia. Para cada muestra se hacía un recuento de al menos 200 células.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comenzando por los ensayos de estrés por dilución, se pudo observar que tras siete días de cultivo el medio condicionado tuvo un efecto protector en ambas líneas de *Arabidopsis thaliana*, aunque se vieron resultados con mayor contraste en los cultivos de Ler. En la Fig. 1 se puede

observar la viabilidad celular de cada muestra a las 24 horas posteriores al inicio del tratamiento. Mientras que en la Fig. 2 se presentan los porcentajes de viabilidad de las muestras a las 168 horas.

Por otro lado, en cuanto al tratamiento con estrés por cizalla, también se observaron diferencias en los cultivos con medio acondicionado y aquellos con solamente medio fresco. En la Fig. 3 se muestra la viabilidad celular de cada muestra en cada tiempo de recuento. Se observó mayor diferencia a las 24 horas.

4. CONCLUSIONES

Como se ha podido comprobar con los resultados obtenidos, el medio condicionado aporta un efecto protector que inhibe la muerte celular programada inducida tanto por el estrés por cizalla por agitación mecánica, como por el estrés debido a elevadas tasas de dilución en los cultivos. Sin embargo, estos ensayos se deben de repetir e implementar en la escala de biorreactor para poder confirmar definitivamente la hipótesis y poder darle una aplicación industrial al medio condicionado.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está subvencionado por el Proyecto PID2021-1279330B-C21 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ y FEDER a MEC y JW, Catedra BIONET en Biotecnología y el proyecto AGROALNEXT del Plan de Recuperación y Resiliencia. Ayuda DIN2020-011559 financiada por MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 y según proceda, por “FSE Invierte en tu futuro” o por la “Unión Europea NextGenerationEU/PRTR”.

6. REFERENCIAS

1. McCabe PF, Levine A, Meijer PJ, Tapon NA, Pennell RI. A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low cell density. *Plant J.* 1997;12(2):267-80.
2. McCabe PF, Leaver CJ. Programmed cell death in cell cultures. En: Lam E, Fukuda H, Greenberg J, editores. *Programmed Cell Death in Higher Plants* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2000 [citado 22 de febrero de 2023]. p. 115-24. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-94-010-0934-8_9

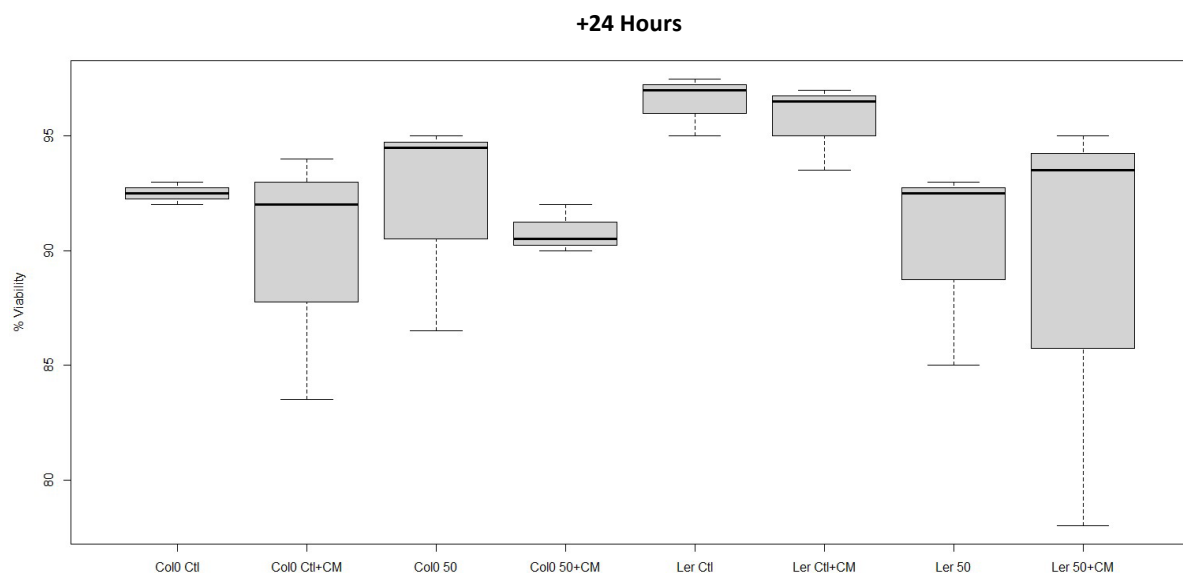


Figura 1. Diagrama de cajas donde se representa la viabilidad celular de las muestras del ensayo de estrés por dilución tras 24 horas.

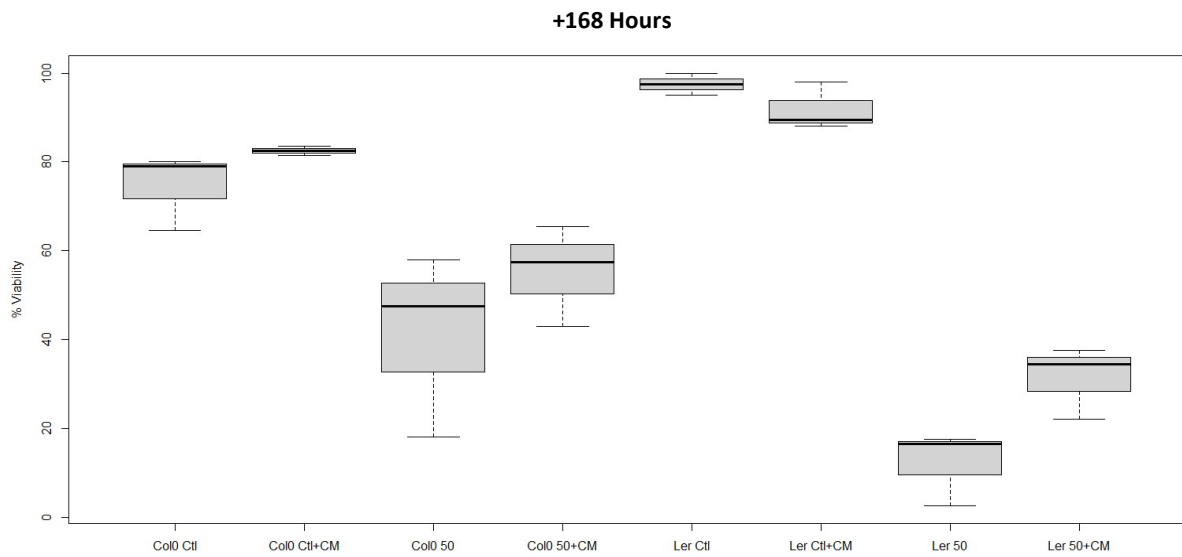


Figura 2. Diagrama de cajas donde se representa la viabilidad celular de las muestras del ensayo de estrés por dilución tras 168 horas.

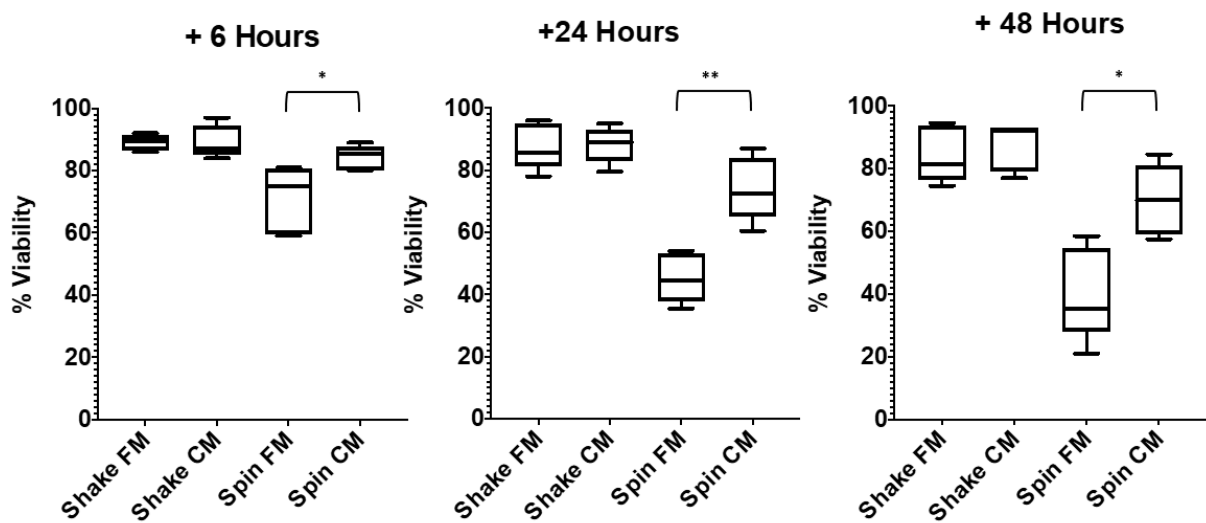


Figura 3. Diagramas de caja representando la viabilidad de cada muestra tras 6, 24 y 48 horas del inicio del ensayo de estrés por cizalla. Las muestras son: agitación orbital con medio fresco (Shake FM) o medio condicionado (Shake CM); agitación mecánica con medio fresco (Spin FM) o medio condicionado (Spin CM).

La adopción a largo plazo de labranza reducida y abonos verdes mejora las propiedades fisicoquímicas del suelo y aumenta la abundancia de bacterias beneficiosas en un huerto de almendros de secano mediterráneo

Long-term adoption of reduced tillage and green manure improves soil physicochemical properties and increases the abundance of beneficial bacteria in a Mediterranean rainfed almond orchard

O. Özbolat^{1*}, V. Sánchez-Navarro¹, R. Zornoza¹, M. Egea-Cortines¹, J. Cuartero², M. Ros², Jose A. Pascual², C. Boix-Fayos², M. Almagro², J. de Vente², E. Díaz-Pereira², M. Martínez-Mena²

¹Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

²Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CSIC), Campus Universitario de Espinardo, 30100 Murcia, España

*ozbolat.o@gmail.com

Resumen

El uso intensivo de maquinaria y labranza crea una fuerte presión sobre los agroecosistemas al alterar las características fisicoquímicas y biológicas del suelo. En este estudio, nuestro objetivo fue evaluar los cambios en las propiedades fisicoquímicas del suelo y la estructura de la comunidad bacteriana del suelo, después de 10 años implementando labranza reducida más abono verde en una almendra (*Prunus dulcis* Mill.) mediterránea de secano. Estas aplicaciones aumentaron significativamente el carbono orgánico total, el nitrógeno total y el carbono orgánico particulado del suelo. La comunidad bacteriana cambió significativamente con un manejo que favorecía los géneros bacterianos beneficiosos. Una combinación de labranza reducida y abono verde podría representar una gestión sostenible para los huertos de almendros de secano.

Palabras clave: Bacteria; diversificación de cultivos; gestión sostenible; labranza; abono verde

Abstract

Intensive use of machinery and tillage creates heavy pressure on agroecosystems by altering the soil physicochemical and biological characteristics. In this study we aimed to assess the changes in soil physicochemical properties and the soil bacterial community structure, following 10 years implementing reduced tillage plus green manure in a rainfed Mediterranean almond orchard. Reducing tillage and applying green manure significantly increased total organic carbon, soil total nitrogen and particulate organic carbon was increased. The bacterial community significantly changed with management favoring beneficial bacterial genera. A combination of reduced tillage and green manure could represent a sustainable management for rainfed almond orchards.

Keywords: Bacteria; crop diversification; sustainable management; tillage; green manure

1. INTRODUCCIÓN

Las prácticas agrícolas como el monocultivo o la diversificación de cultivos, la labranza y la adición de fertilizantes, junto con el tipo de cultivo, son los principales factores que controlan las propiedades del suelo, la biodiversidad y la productividad de los cultivos en las áreas cultivadas. Dentro de los componentes del suelo, los microbios del suelo, y específicamente las bacterias del suelo, son esenciales en la provisión de múltiples funciones del suelo, como la producción de biomasa, el almacenamiento y el ciclo de nutrientes, la filtración y transformación de contaminantes, el almacenamiento de carbono, la retención e infiltración de agua, la aireación, etc. (1). Por lo tanto, es fundamental seleccionar aquellas prácticas de gestión que mejor contribuyan a aumentar la abundancia bacteriana y la biodiversidad y mejorar las características del suelo, como el contenido de carbono orgánico, la concentración de nutrientes, la agregación o la disponibilidad de agua, para contribuir a la sostenibilidad a largo plazo de la agro-ecosistemas (2).

La labranza es una práctica común que puede afectar las propiedades del suelo y puede desencadenar la erosión del suelo, afectando en última instancia la estructura y la actividad de la comunidad microbiana del suelo. En esta línea, la mayoría de los huertos frutales de clima mediterráneo se someten a un intenso laboreo con suelo desnudo durante la mayor parte del año, con el fin de disminuir la competencia hídrica con las malas hierbas. Esto se hace porque los agricultores temen que la competencia con la vegetación de callejones pueda reducir la producción de frutos. Las desventajas de la labranza intensiva y el mantenimiento de suelos desnudos pueden minimizarse no solo con la adopción de labranza reducida sino también con la implementación de abonos verdes. La labranza reducida asociada con el abono verde en los huertos puede mejorar las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo debido a la liberación de exudados de raíces mientras el cultivo está creciendo y la incorporación de residuos, lo que lleva a acumulaciones significativas de material orgánica del suelo y nutrientes (3). Investigaciones anteriores han demostrado que la labranza cero y la labranza reducida junto con el abono verde pueden aumentar la biomasa microbiana, la diversidad microbiana y la actividad enzimática (4).

Los objetivos de este estudio fueron: i) investigar los efectos a largo plazo de la labranza reducida y el abono verde sobre las propiedades fisicoquímicas del suelo y la estructura de la comunidad bacteriana del suelo en un huerto mediterráneo de almendros en comparación con un monocultivo bajo labranza intensiva convencional; y ii) evaluar las relaciones entre la estructura de la comunidad bacteriana del suelo y las propiedades fisicoquímicas en respuesta a cambios en las prácticas de manejo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Sitio de estudio y montaje experimental

En 2009 se estableció un experimento de campo en un huerto de almendros (*Prunus dulcis Mill.*) de 5000 m² situado en la Región de Murcia, España. El cultivo del almendro se cultiva en régimen de secano orgánico. Los tratamientos fueron: i) monocultivo de almendro bajo labranza convencional (CT); ii) monocultivo de almendras bajo labranza reducida (RT); y iii) huerto de almendros bajo labranza reducida diversificado con *Avena sativa L.* y *Vicia sativa L.* (RTD).

2.2 Muestreo de suelo, rendimiento del cultivo y biomasa aérea de la vegetación de callejones

Se tomaron muestras del suelo antes de la labranza en noviembre de 2019 a una profundidad de 0 a 10 cm. Las muestras se dividieron en dos grupos, como análisis fisicoquímico (secado) y análisis biológico (conservado en refrigeración). Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las normas ISO.

2.3 Análisis fisicoquímicos de suelos

El carbono total, el carbono orgánico total (TOC) y el nitrógeno total (Nt) se determinaron mediante un analizador elemental. El TOC se midió después de eliminar los carbonatos del suelo mediante la adición de HCl. Carbono orgánico total particulado (POC), definido como material orgánico fresco o en descomposición se midió.

2.4 Aislamiento de ADN y secuenciación 16S

La extracción de ADN del suelo se llevó a cabo utilizando el kit DNeasy PowerSoil (QIAGEN). Asignaciones de valores de pureza y concentración se realizaron con un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific) y con un fluorómetro Qubit® 2.0 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) combinado con el kit de ensayo Qubit dsDNA HS (Thermo Fisher Scientific), respectivamente. La amplificación de las regiones hipervariables 16S bacterianas se realizó con el kit de metagenómica Ion 16S™ (ThermoFisher Scientific). El proceso de preparación de bibliotecas se llevó a cabo con el kit de preparación de bibliotecas de fragmentos de gDNA Ion Xpress™ Plus (ThermoFisher Scientific). La reacción de secuenciación se llevó a cabo con el sistema Ion PGM™, el servidor de torrents Ion PGM™ y el kit de secuenciación Ion PGM™ Hi-Q™ View apropiado (Thermo Fisher Scientific) compatible con chips de secuenciación del kit Ion 316™ Chip v2. El proceso de bioinformática posterior se realizó con QIME y el análisis estadístico con el software R.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El rendimiento del cultivo y la biomasa aérea de la vegetación de callejones fueron similares en todos los tratamientos, con valores medios de 349 kg ha⁻¹ y 120 g m⁻², respectivamente. Ellos no fueron afectados por tratamientos agrícolas en este estudio.

TOC fue significativamente mayor en RTD en comparación con CT; Nt y POC fueron significativamente más altos en los tratamientos RT y RTD en comparación con CT (Tabla 1). Se observa que la labranza reducida y la aplicación de abono verde mejoran el suelo con más fuentes de carbono y nitrógeno.

La concentración de ADN fue significativamente mayor en RTD, sin diferencias significativas entre CT y RT. La comunidad bacteriana a nivel de OTU fue significativamente diferente entre los tratamientos (R-ANOSIM = 0,57; p < 0,001). Los géneros bacterianos más dominantes fueron Blastococcus (28,26 %), Rubrobacter (12,43 %), Nocardioideas (12,06 %) y Solirubrobacter (11,20 %) (Fig. 1). Solo tres géneros mostraron diferencias significativas entre tratamientos. Blastococcus mostró una abundancia significativamente mayor en CT y RT que en RTD (p < 0,05), mientras que Streptomyces y Solirubrobacter mostraron una abundancia significativamente mayor en RTD (p < 0,01) (Fig. 1). La mayor abundancia relativa de Streptomyces en RTD puede considerarse como un indicador positivo de la productividad del suelo y el biocontrol. Streptomyces está altamente asociado con la fertilidad del suelo, el crecimiento de las plantas y los altos rendimientos de los cultivos.

4. CONCLUSIONES

La labranza reducida asociada con abono verde durante 10 años promovió un aumento en el contenido de carbono orgánico y nitrógeno total del suelo sin afectar negativamente los rendimientos de almendras, contribuyendo a la sostenibilidad general del agro ecosistema. Las bacterias del suelo se asociaron significativamente con una variación en el carbono orgánico del suelo, con una mayor presencia de bacterias beneficiosas relacionadas con la productividad y fertilidad del suelo con un mayor contenido de materia orgánica del suelo.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el proyecto Diverfarming de la Comisión Europea Horizonte 2020 [acuerdo de subvención 728003].

6. REFERENCIAS

1. Drijber RA, Doran JW, Parkhurst AM, Lyon DJ. Changes in soil microbial community structure with tillage under long-term wheat-fallow management. *Soil Biol Biochem.* 2000;
2. Soto RL, Martínez-Mena M, Padilla MC, de Vente J. Restoring soil quality of woody agroecosystems in Mediterranean drylands through regenerative agriculture. *Agric Ecosyst Environ.* 2021;306:107191.
3. Almagro M, Ruiz-Navarro A, Díaz-Pereira E, Albaladejo J, Martínez-Mena M. Plant residue chemical quality modulates the soil microbial response related to decomposition and soil organic carbon and nitrogen stabilization in a rainfed Mediterranean agroecosystem. *Soil Biol Biochem.* 2021 May;156:108198.
4. Zuber SM, Villamil MB. Meta-analysis approach to assess effect of tillage on microbial biomass and enzyme activities. *Soil Biol Biochem* [Internet]. 2016;97:176–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.03.011>

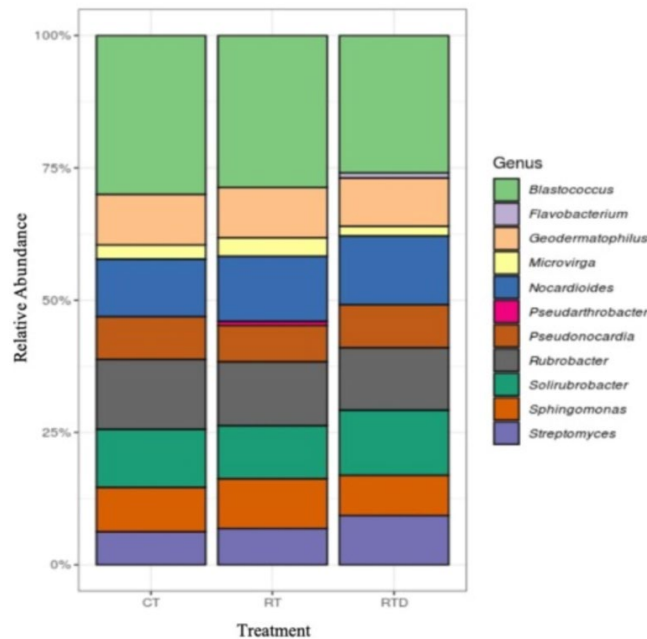


Figura 1. Abundancia relativa (>1%) de géneros bacterianos en los tres tratamientos.

Tabla 1. Carbono orgánico total (TOC), nitrógeno total (Nt), carbono orgánico particulado (POC), concentración de amonio (NH₄) de un huerto de almendros bajo diferentes prácticas agrícolas.

Tratamiento	TOC (g/kg)	Nt (g/kg)	POC (g/kg)	NH ₄ (mg/kg)
CT	17.09 ± 2.53a	1.50 ± 0.17 a	6.14 ± 1.42 a	2.24 ± 1.35
RT	18.21 ± 1.31ab	1.86 ± 0.14b	10.21 ± 2.86b	3.36 ± 2.14
RTD	19.49 ± 2.69b	1.75 ± 0.23b	11.65 ± 2.09b	3.32 ± 1.61
Significativa	p < 0.01	p < 0.001	p < 0.01	ns

Efecto de la selección y el año estación sobre las características de crecimiento de *Sparus aurata*

Effect of selection and season year on growth traits of *Sparus aurata*

M. Marín*, A. Vallecillos, E. María Dolores, E. Armero

Departamento de Ingeniería Agronómica, ETSIA. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España

*maria.marin@upct.es

Resumen

La dorada es una especie que ocupa un papel importante dentro de la acuicultura española y cuya crianza se ha consolidado dentro del contexto europeo. A pesar de ello, su producción industrial presenta aun importantes inconvenientes como son la presencia de anomalías morfológicas desde edades muy tempranas o crecimientos no maximizados, entre otros. El objetivo de este trabajo ha sido analizar el crecimiento de diferentes poblaciones de dorada en diferentes años-estaciones. Se han observado diferentes ritmos de crecimientos en la población del Atlántico estudiada en 2009 y 2017, pero no en la población del mediterráneo cuando se estudió en 2016 y 2017. También se ha encontrado como la selección por crecimiento tras dos generaciones ha conducido a un incremento del peso del 8,8%. Se van a realizar futuros trabajos en los que se analicen caracteres de calidad de canal y de carne.

Palabras clave: Selección; año estación; peso; talla.

Abstract

The sea bream is a species that occupies an important role within Spanish aquaculture and whose breeding has been consolidated within the European context. Despite this, its industrial production still presents important drawbacks such as the presence of morphological anomalies from very early ages or non-maximized growth, among others. The objective of this work has been to analyze the growth of different batches of sea bream, make a summary of all the data, carry out an analysis of them through descriptive statistics focusing on two variables, weight and size and describe the effect of selection. and of the season of the year on the growth of the different lots.

Keywords: Selection; year season; weight; size.

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una actividad en gran crecimiento y un sector fundamental en la conservación de nuestro medio acuático así como de la alimentación futura. Hace ya años la ONU advertía del agotamiento de los recursos pesqueros para el año 2050. En la actualidad, según la FAO, alrededor del 34,2 % de las poblaciones de peces están sobreexplotadas. Si a esto le sumamos la contaminación del agua y el cambio climático cada año más acuciante, vemos como la acuicultura se convierte en una actividad provechosa e imprescindible. Sin embargo, las estrategias de mejora para las especies acuícolas han sido muy escasas. La dorada es una de las

especies más importantes del área mediterránea para la pesca y la acuicultura (1). El objetivo de este trabajo ha sido analizar el crecimiento midiendo valores de peso y talla de lotes de dorada procedentes de diferentes poblaciones atlánticas y mediterráneas teniendo en cuenta el efecto del año estación y de la selección.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El material utilizado en este trabajo abarca los datos de tres proyectos dirigidos a la selección genética de dorada *Sparus aurata* (Progenia I abril 2009, II febrero 2016 y III febrero 2017). Se ha analizado dos poblaciones diferentes: la población del Atlántico sin que haya sido sometida a ningún proceso de selección en abril de 2009 (OATL09AB) y en febrero de 2017 (OATL17FEB) y también tras 2 generaciones de selección por crecimiento (2ATL17FEB) y la población del Mediterráneo sin ningún proceso de selección en febrero de 2016 (0MED16FEB), y 2017 (0MED17FEB). Los peces estaban marcados mediante el sistema Passive Integrated Transponder (PIT) y fueron criados en una jaula en el mar. En las diferentes poblaciones se midió peso y talla a diferentes edades en un número determinado de peces que se muestra en la tabla 1. El peso se midió con una balanza de precisión de 0,001 gramos y la longitud con un ictiómetro.

Los datos fueron analizados mediante el programa de estadística SPSS v27 (2) tras comprobar su normalidad con el test de Kolmogorov-Smirnov. Para su análisis se utilizó un modelo lineal general que incluía como efecto fijo la población (OATL, 0MED, 2ATL) y el año estación (09AB, 16FEB, 17FEB) según el caso.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respecto al efecto del año-estación, se observa que a los 230 días post-eclosión (dpe) la población OATL09AB crece mejor que la OATL17FEB pero a partir de los 600 días empieza a observarse lo contrario, la población OATL17FEB obtiene mejores datos. Si comparamos las poblaciones del Mediterráneo en febrero de 2016 y 2017, al inicio, hacia los días 230/270 dpe, la población 0MED16FEB presentó mayor valor de peso medio que la 0MED17FEB. Para edades más avanzadas no las podemos comparar porque se pesaron en edades diferentes, pero si calculamos la ganancia media diaria (GMD), observamos que 0MED16FEB crece 0,539 g/día y 0MED17FEB crece 0,532 g/día, por tanto, vemos que al inicio la 0MED16FEB era más grande pero después vemos como la ganancia media diaria fue similar en ambas poblaciones, por lo que es de esperar que el peso final sea semejante. Así, si estimamos el peso a los 762 días en la población 0MED16FEB sería de 284,4 g frente a los 317,6 de la 0MED17FEB, por lo que observamos que estas dos poblaciones se comportan de manera muy similar (Fig. 1).

No hemos encontrado trabajos que estudien el efecto año/estación. En García-Celdrán y col. (2) se comparaban diferentes poblaciones una procedente del Atlántico y otra del Mediterráneo (zona norte/Cataluña), observando que la población del Mediterráneo era de mayor tamaño que la del Atlántico, al contrario que en nuestro trabajo ya que a los 600 días la población del Atlántico tuvo un mayor peso que la del Mediterráneo. Si las comparamos a los 600 días casi se obtiene una diferencia en peso de 30 g más. Los datos para la talla se corresponden con lo hallado para el peso.

Por último, el efecto de la selección sobre el peso, vemos que al inicio, hacia los 230 días la diferencia no llega a 3 g (20,9% más que la población no seleccionada), y al final la diferencia fue 20,9 g (8,8% más que la población no seleccionada) por tanto sí influye el factor selección (Fig. 2). Para la talla sin embargo no existe apenas diferencia, los valores son de 24,6 frente a 25,2 cm, esto indica que el incremento de peso se produce claramente en el volumen del animal y no en la longitud. Un efecto similar ha sido observado por Carballo y col. (4) quienes observaron que la selección por crecimiento había conducido a mayor peso inicial cuando eran comparados a 80 y 140 dpe. Sin embargo, el efecto de la talla tendía a desaparecer (para los 80 y los 140 días). Esto es consecuencia de una selección realizada utilizando como criterio el peso y no la talla. Por tanto,

vemos un efecto del año estación en el caso de la población del atlántico cuando se comparan con 8 años de diferencia, pero no se observa en la población del Mediterráneo cuando se comparan años consecutivos.

4. CONCLUSIONES

El efecto del año estación depende de las poblaciones comparadas y de la distancia entre los años comparados, en cualquier caso, será un efecto a tener en cuenta en los modelos matemáticos. El efecto de la selección por crecimiento usando como criterio el peso es eficiente en cuanto a que se incrementa el peso, pero no se acompaña de un incremento de la talla. Otros caracteres de calidad de canal y carne serán analizados en futuras investigaciones.

5. AGRADECIMIENTOS

A la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente como entidad financiadora del Desarrollo de un programa de mejora genética en dorada.

6. REFERENCIAS

1. APROMAR. La acuicultura en el mundo (2022)
2. SPSS Statistics V27. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 27.0. Armonk, NY: IBM Corp
3. García-Celdrán, M., Ramis, G., Manchado, M., Estévez, A., Afonso, J.M., María-Dolores, E., Peñalver, J., Armero, E., 2015. Estimates of heritabilities and genetic correlations of growth and external skeletal deformities at different ages in a eared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) population sourced from three broodstocks along the Spanish coasts. *Aquaculture* 445, 33–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.04.006>.
4. Carballo, C., Shin, H.S., Berbel, C., Zamorano, M.J., Borrego, J.J., Armero, E., Afonso, J.M., Manchado, M., 2020. Heritability Estimates and Genetic Correlation for Growth Traits and LCDV Susceptibility in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). *Fishes* 5, 2. <https://doi.org/10.3390/fishes5010002>.

Tabla 1. Número de datos por población y edad (días)

EDAD (días)	0ATL09AB	0ATL17FEB	2ATL17FEB	0MED16FEB	0MED17FEB
163	308				
230		178	36		64
250	67			491	
272			325		367
368	120				
516	102				
600		178	36		64
660	79				
690	233				
762				382	
980				464	

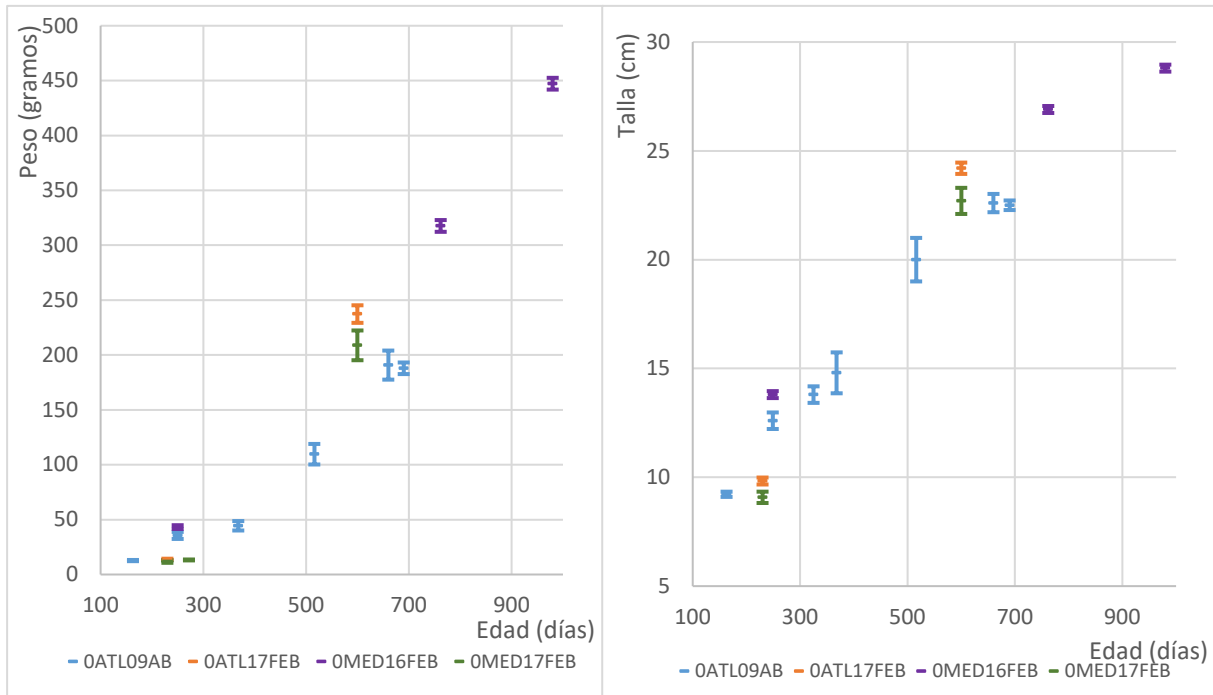


Figura 1. Evolución del peso y la talla en función de la edad de las diferentes poblaciones de dorada: Atlántica de abril de 2009 (OATL09AB) y de febrero de 2016 (OATL16FEB) y Mediterránea de febrero de 2016 (OMED16FEB) y de febrero de 2017 (OMED17FEB)

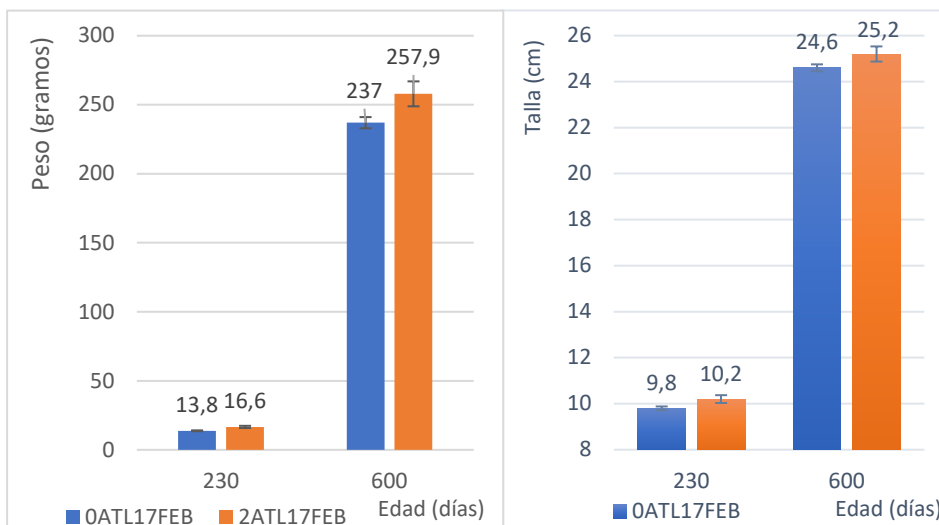


Figura 2. Efecto de la selección por crecimiento a los 230 y 600 días post-eclosión en la población de dorada Atlántica en febrero de 2017: sin seleccionar (OATL17FEB) y tras dos generaciones de selección (2ATL17FEB)

Control genético del quimiotipo en *Cannabis sativa*

Genetic control of the chemotype in *Cannabis sativa*

A. Gila-Navarro*, J. Weiss, M. Egea-Cortines

Instituto de Biotecnología Vegetal, Departamento de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena. Campus Muralla de Mar, s/n, edificio I+D+i, Cartagena 30202, Murcia, España.

*alberto.gila@upct.es

Resumen

El modelo actual de herencia del quimiotipo en Cannabis sativa se centra en las dos sintasas terminales de la ruta biosintética de los cannabinoides, THCAS y CBDAS. Sin embargo, el modelo ignora la posible contribución de la regulación de la expresión génica de estas enzimas a la determinación del quimiotipo. En el presente trabajo en curso se muestra una red de regulación génica con los posibles factores de transcripción que regulan a THCAS y CBDAS y se debaten posibles implicaciones.

Palabras clave: Cannabinoides; expresión génica; factores de transcripción; red de regulación génica.

Abstract

The current model of chemotype inheritance in Cannabis sativa revolves around the two terminal synthases of the cannabinoid biosynthesis pathway, the THCAS and CBDAS. However, the model ignores the possible contribution of the regulation of these enzymes' gene expression to the determination of the chemotype. In the present on-going work, we present a gene regulatory network inferred in silico with the candidate transcription factors that regulate the expression of the THCAS and CBDAS and discuss possible implications.

Keywords: Cannabinoids; gene expression; transcription factors; gene regulatory networks.

1. INTRODUCTION

Cannabis is today the source of a multibillion-dollar industry pharmaceutical industry thanks to the compounds it produces, the cannabinoids. Specifically, THC (Δ -9 tetrahydrocannabinol) and CBD (cannabidiol) have therapeutic value in treating insomnia, chronic pain, and cancer among other applications. (1), (2), (3).

Therefore, the single most relevant trait of the plant is the synthesis of cannabinoids. Different varieties have a different quantity and relative abundance of these compounds. The final step of the pathway is where the genetic model focuses on. Here, several terminal synthases, like THCAS and CBDAS compete for a common precursor called CBGA to form different cannabinoids.(4)

The model is a biallelic codominant one with one locus for the THCAS and one for the CBDAS. These loci are comprised of several paralogs tightly linked that get inherited together, but only one of them is actively expressed. The model divides the alleles of THCAS and CBDAS into functional and non-functional. Depending on the combination of alleles, the plant will produce a different ratio of THC to CBD. A plant with two, one of none functional allele for a particular synthase will accumulate high, low or null quantities of that cannabinoid .(5)

The model however does not consider the likely effect of gene regulation of the synthases on the chemotype determination. This would be an independent extra layer of control on top of the alleles. Mutations in either CIS and/or TRANS regulatory elements like promoters and

transcription factors may also contribute to the chemotype. In this work we present a gene regulatory network inferred *in silico* with the putative candidates that regulate the expression of the CBDAS and THCAS. Understanding the control of the expression of the cannabinoid synthases will provide insight into other elements that contribute to the chemotype and may be targets for breeders.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Data used

We downloaded from the NCBI database a total of 123 RNAseq datasets from *Cannabis sativa* trichomes. The data originates from 4 different studies (NCBI BioProject accession numbers: PRJNA560453, PRJNA599437, PRJNA498707, PRJNA483805) and contains a total of 16 varieties. This data was combined with 15 additional RNAseq dataset generated by ourselves originating from 3 varieties of the company LinneoHealth S.L.

2.2 Differential gene expression

The data in FASTQ format was first analyzed with FastQC and the reads were edited when necessary with Trimmomatic. To quantify the gene expression, we used Salmon and the R package Tximport from Bioconductor. Lowly expressed genes were discarded. Two negative-binomial GLMs (generalized linear model) were fit with the edgeR package. The independent variables are the *variety* and the *experiment* from which it comes. The model using the *variety* was used to perform all 1-vs-1 and 1-vs-all comparisons between plants. The model using the *experiment* was used to mitigate the batch effect.

2.3 Dataset visualization

The count matrix was transformed to log₂CPM using the normalization factors calculated with the TMM method of edgeR. The PCA method was used as dimensionality reduction. The expression level of the cannabinoid synthases was then visualized as a barplot.

2.4 Gene regulatory networks

A list of TFs (Transcription Factors) from *Cannabis sativa* was retrieved after annotating with GO terms the reference transcriptome using Sma3. The keywords “transcription factor” were used to obtain a list of possible TFs. This was then manually curated and filtered to include only differentially expressed TFs in any of the contrasts. The end list contains 870 genes.

These TFs together with the log₂CPM transformed count matrix were inputted to ARACNe to infer the gene regulatory network.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The expression pattern of the THCAS and CBDAS enzymes differs. As can be seen in Fig.1 , the THCAS is expressed moderately in many varieties. However, CBDAS is highly expressed only in some varieties. The varieties with an above average level of expression are coincidentally the ones that accumulate a high quantity of CBD. This indicates that the CBDAS expression could be used as a marker to discriminate high and low CBD producing chemotypes. The production of CBD is thus determined not only by the allele a plant has, like it has been proven in (5) and (6) but also by its expression level. We do not know yet if this is due to CIS or TRANS regulatory elements polymorphisms.

For the THCAS, gene expression alone cannot explain the differences in chemotype. Other factors such as sequence polymorphisms that affect the catalytic activity or the enzyme localization within the cell may play a bigger role in this case. Other studies have identified QTLs related to CBD/THC balance which are located in different chromosomes and may be related to this.(7)

The gene regulatory network (Fig.2) shows that CBDAS and THCAS are mostly controlled by a different set of TFs. CBDAS was also linked to fewer TFs than THCAS. Interestingly, the TFs that regulate CBDAS according to the network include two transposases (RICESLEEPER and DAYSLEEPER)(8). The implications of this links are unknown. Regarding THCAS, it is controlled by TFs belonging to families that in *Arabidopsis thaliana* are known to be related to abiotic stress response, like SRM, GT, RAP or NLP

There are two studies that identified TFs from *Cannabis sativa* involved in cannabinoid (9) (10) and anthocyanin biosynthesis belonging to the AP2, MYB and WRKY families. The MYB and AP2 family are represented in our network but the TFs from these works do not appear. An experimental validation of our network through yeast-one-hybrid assay is currently undergoing

4. CONCLUSIONS

THCAS expression is not directly correlated to the synthesis of THC. CBDAS expression on the contrary can discriminate between high and low CBD-producing plants. The expression of the synthases is controlled by a different set of TFs which are related to different processes.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by Project PID2021-127933OB-C21 financed by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and FEDER to M. Egea-Cortines and J. Weiss. A. Gila-Navarro received an FPU fellowship FPU21/02130 from the Spanish Ministry of Universities

6. REFERENCES

1. Kuhathasan N, Dufort A, MacKillop J, Gottschalk R, Minuzzi L, Frey BN. The use of cannabinoids for sleep: A critical review on clinical trials. *Exp Clin Psychopharmacol.* 2019;27:383–401.
2. Johal H, Devji T, Chang Y, Simone J, Vannabouathong C, Bhandari M. Cannabinoids in Chronic Non-Cancer Pain: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord.* 2020 Jan;13:117954412090646.
3. Mangal N, Erridge S, Habib N, Sadanandam A, Reebye V, Sodergren MH. Cannabinoids in the landscape of cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2021 Sep 1;147(9):2507–34.
4. Hurgobin B, Tamiru-Oli M, Welling MT, Doblin MS, Bacic A, Whelan J, et al. Recent advances in Cannabis sativa genomics research. *New Phytol.* 2021;230(1):73–89.
5. Wenger JP, Dabney III CJ, ElSohly MA, Chandra S, Radwan MM, Majumdar CG, et al. Validating a predictive model of cannabinoid inheritance with feral, clinical, and industrial Cannabis sativa. *Am J Bot.* 2020;107(10):1423–32.
6. Weiblen GD, Wenger JP, Craft KJ, ElSohly MA, Mehmedic Z, Treiber EL, et al. Gene duplication and divergence affecting drug content in Cannabis sativa. *New Phytol.* 2015;208(4):1241–50.
7. Campbell LG, Dufresne J, Sabatinos SA. Cannabinoid Inheritance Relies on Complex Genetic Architecture. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2020 Mar;5(1):105–16.
8. Knip M, de Pater S, Hooykaas PJ. The SLEEPERgenes: a transposase-derived angiosperm-specific gene family. *BMC Plant Biol.* 2012 Oct 16;12(1):192.
9. Liu Y, Zhu P, Cai S, Haughn G, Page JE. Three novel transcription factors involved in cannabinoid biosynthesis in Cannabis sativa L. *Plant Mol Biol.* 2021 May 1;106(1):49–65.
10. Kundan M, Gani U, Fayaz Mohd, Angmo T, Kesari R, Rahul VP, et al. Two R2R3-MYB transcription factors, CsMYB33 and CsMYB78 are involved in the regulation of anthocyanin biosynthesis in Cannabis sativa L. *Ind Crops Prod.* 2022 Nov 15;188:115546.

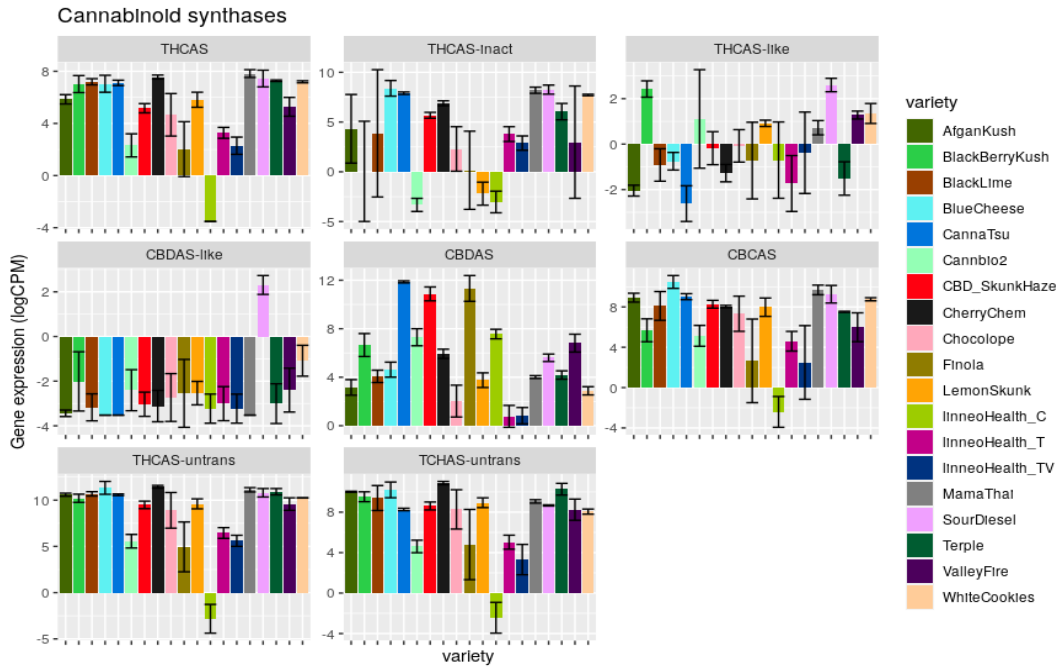


Figure 1. Cannabinoid synthases gene expression in logCPM values

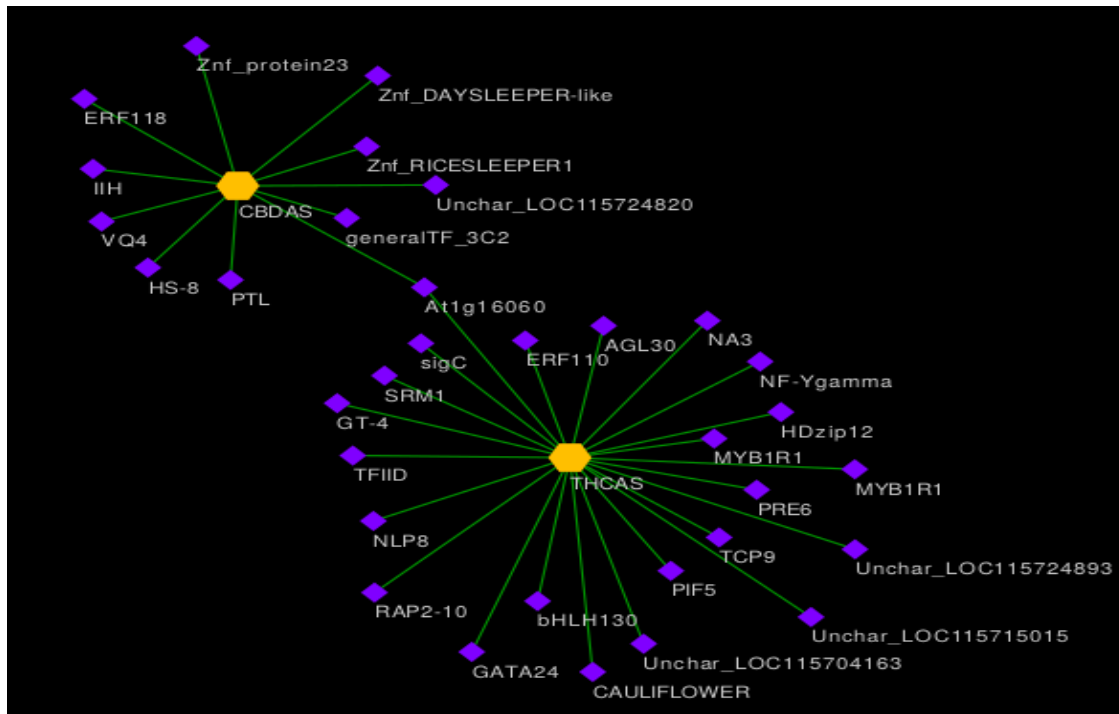


Figure 2: ARACNe gene regulatory network of CBDAS and THCAS