

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

**DETERMINACIÓN RÁPIDA DE NITRATO EN VEGETALES PARA
MINIMIZAR TOXICIDAD EN HUMANOS O RUMIANTES**

por

Laura ARLÓ CÁFARO

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magister en Ciencias Agrarias
Opción Ciencias del Suelo

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2009**

Tesis aprobada por:

Ing. Agr. Carlos Perdomo (Ph.D.)

Ing. Agr. Verónica Ciganda (Ph.D.)

Ing. Agr. Alejandro La Manna (Ph.D.)

Fecha: -----

Autor: -----
Ing. Agr. Laura Arló Cáfaró

Director: -----
Ing. Agr. Mónica Barbazán (Ph.D.)

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de Tesis Dra. Mónica Barbazán por su valiosa orientación y apoyo permanente en este trabajo.

A Carlos Perdomo por sus significativos aportes y por permitirme realizar este trabajo en el marco de sus proyectos.

A Verónica Ciganda y Alejandro La Manna por aceptar formar parte del tribunal.

A Andrés Beretta por su disposición a participar en la discusión y análisis de datos en forma comprometida y desinteresada.

A Omar Casanova y Aurora Cerveñasky por permitirme trabajar en sus ensayos.

A Patricia Barreto por su compañerismo y valiosa ayuda.

A Amabelia del Pino por sus comentarios y sugerencias.

A Carolina Munka por su colaboración en el procesamiento de la información agroclimática presentada.

A Amilcar Rodríguez y Daniel Arana por la ayuda en el campo.

A mis compañeras(o) del grupo de trabajo, Patrizia Coscia, Gabriela Moroni, Mónica Martínez y Pablo Rovira por su colaboración a largo de estos años lo que me facilitó una alta dedicación a los cursos y a la tesis de maestría.

A Jorge Monza por facilitarme el uso del laboratorio de Bioquímica y especialmente a Pedro Díaz por su disposición ante cualquier consulta.

Muy especialmente a Heriberto Barbazán y Pablo Rivera por su valiosa ayuda: la fabricación de la prensa hidráulica utilizada.

A familiares y demás compañeros y amigos que de una u otra forma me ayudaron.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	VI
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	9
Nitrito en planta.....	10
Nitrito en humanos y animales.....	12
Métodos de determinación de nitrito en plantas.....	15
II. DETERMINACIÓN RÁPIDA DE NITRATO EN JUGO DE TEJIDO FRESCO DE HORTALIZAS	16
RESUMEN.....	17
SUMMARY	18
INTRODUCCIÓN	19
MATERIALES Y MÉTODOS	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA	30
III. TEST RÁPIDO DE NITRATO COMO INDICADOR DEL ESTATUS DE NITRÓGENO EN GRAMÍNEAS FORRAJERAS	33
RESUMEN.....	33
SUMMARY	34
INTRODUCCIÓN	36
MATERIALES Y MÉTODOS	40
Características de los experimentos	40
Muestreo de suelos.....	40
Recolección de muestras vegetales, extracción y determinación de nitrito ...	43
Metodología de determinación de niveles críticos y análisis estadístico.....	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
Riesgo de intoxicación en bovinos y nitrito en plantas	46
Concentración de nitrito en jugo de tejido fresco para planta entera y base de tallos	48
Relación entre la concentración de nitrito en tejido seco y fresco para planta entera y base de tallos.....	50
Rendimiento de materia seca de forraje al primer corte y determinación de niveles críticos.....	53
Respuesta del raigrás al agregado de nitrógeno	53
Niveles de nitrito en base de tallos	55
Relación entre los niveles de nitrito en base de tallos y en el suelo al momento de la recolección de las muestras vegetales	58

CONSIDERACIONES FINALES	60
BIBLIOGRAFIA	63
IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES	68
V. RESUMEN.....	70
VI. BIBLIOGRAFÍA GENERAL.....	71

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS - ARTÍCULO I

- Figura 1. Relación entre la concentración de NO_3^- medida por colorimetría (y) y potenciometría (x) para las tres especies (acelga, espinaca y lechuga). El método colorimétrico fue el de nitración del ácido salicílico en jugo de tejido fresco (C-TF) y el potenciométrico fue el del electrodo de actividad específica en extracto de tejido seco (P-TS). Los círculos y rectángulos negros representan, a las muestras de acelga y lechuga, respectivamente y los círculos vacíos representan a las muestras de espinaca. La línea central representa el modelo ajustado ($y = 0,04x + 85,45$, $R^2 = 0,69$); y las líneas negras discontinuas límites de confianza al 95%...... 24
- Figura 2. Relación entre la concentración de NO_3^- medida por colorimetría (y) y potenciometría (x) para las tres especies (acelga, espinaca y lechuga). El método colorimétrico fue el de nitración del ácido salicílico en jugo de tejido fresco (C-TF), y los valores obtenidos fueron luego transformados a base seca (C-TF –transformado) con el modelo determinado previamente. El método potenciométrico fue el del electrodo de actividad específica en extracto de tejido seco (P-TS). La línea llena representa el modelo ajustado ($y = -4,08E-13 + 0,99x$) y la línea punteada indica la relación 1:1..... 25
- Figura 3. Relación entre los residuales (y) y la concentración de NO_3^- medida por potenciometría con electrodo de actividad específica para NO_3^- en tejido seco, P-TS (x). Los residuales representan la diferencia entre el contenido de NO_3^- medido por P-TS menos el contenido de NO_3^- medido por colorimetría por nitración del ácido salicílico en tejido fresco y transformado a base seca, C-TF –transformado..... 26
- Figura 4. Relación entre la concentración de NO_3^- medida por colorimetría (y) y potenciometría (x) en muestras de lechuga. El método colorimétrico fue el de nitración del ácido salicílico en jugo de tejido fresco (C-TF) y el potenciométrico fue el del electrodo de actividad específica en extracto de tejido seco (P-TS). La línea negra entera representa la función: $y = 0,036x + 108,87$, $R^2 = 0,64$. El Cuadrante I contiene los puntos que representan muestras con concentraciones de NO_3^- aceptables según el método P-TS pero inaceptable según C-TF; el Cuadrante II contiene valores aceptables según C-TF pero inaceptables según P-TS, de acuerdo al límite propuesto. Los Cuadrantes III y IV representan las muestras aceptadas y rechazadas, respectivamente, por ambos métodos. La delimitación de los cuadrantes se basó en un consumo diario de 5 hojas de lechuga por persona..... 29

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS – ARTÍCULO II

Cuadro 1. Propiedades químicas de los suelos de los ensayos de raigrás (<i>L.multiflorum</i>).	42
Cuadro 2. Rendimiento de materia seca para los tratamientos con N y promedio para cada sitio de los ensayos de raigrás. Resultado del efecto de aplicación de N (ANAVA y contrastes ortogonales) para cada sitio.	55

Figura 1. a) Precipitación mensual del año 2004/2005 (PP), promedio de precipitación mensual de la serie histórica 1972-2002 (PPp), evapotranspiración de referencia mensual del año 2004/2005 (ETo) y ETo climática mensual (ETop), promedio del período 1975-2006, (INIA. Unidad GRAS INIA Las Brujas, 2005); b) déficits (D), excesos hídricos (E) y almacenajes (A), para el suelo con menor lámina de agua disponible (92 mm), (Molfino y Califra, 2001), del período julio 2004 a junio 2005.48	
Figura 2. Relación entre la concentración de NO_3^- en tejido fresco en la base de tallos (BT) (y) y en planta entera (PE) (x) de la misma muestra, determinado por el método colorimétrico por nitración del ácido salicílico en jugo de tejido fresco. La línea entera representa la función: $y = 1,30x$, $R^2 = 0,92$, y la línea punteada indica la relación 1:1.....	50
Figura 3. Relación entre la concentración de NO_3^- en jugo de tejido fresco (y) y en tejido seco (x) de plantas de avena y raigrás. a) en planta entera, b) en la base de tallos. La línea representa el modelo plateau-lineal (PL), a) MAX (-93,2 + 0,11x, 50), $R^2 = 0,91$, b) MAX (-14 + 0,066x, 49), $R^2 = 0,92$	51
Figura 4. Relación entre el rendimiento relativo y la concentración de NO_3^- en jugo de tejido fresco en la base de tallos de plantas de raigrás muestreadas previo al primer corte. Cada círculo representa un bloque. Las líneas en la Figura 4a dividen el gráfico en cuatro cuadrantes según Cate y Nelson; en la Figura 4b representan el modelo lineal-plateau (LP) ajustado para los datos, MIN (34 + 0,32x, 73, $R^2= 0,34$).	56
Figura5. Relación entre la concentración de NO_3^- en la base de tallos de plantas de raigrás (y) y en suelo al momento de la recolección de las muestras vegetales (x). La concentración de NO_3^- en planta se cuantificó en: a) jugo de tejido fresco (JTF) considerando todas las observaciones por sitio; b) JTF sin considerar tres puntos; c) extracto de tejido seco (ETS) considerando todas las observaciones por sitio; d) extracto de tejido seco (ETS) sin considerar los tres puntos omitidos en la Figura 5b. En los cuatros casos (a, b, c y d) la línea continua representa el modelo LP de forma, MIN (a+bx, P). Los niveles críticos fueron 13 y 24 mg N- $\text{NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ para las Figuras a y b respectivamente; 15 y 19 mg N- $\text{NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS para las Figuras c y d, respectivamente.....	59
Figura 6. Relación entre el rendimiento relativo (%) y la concentración de NO_3^- en jugo de tejido fresco, en la base de tallos de plantas de raigrás, bajo tratamiento de cero N. Las líneas enteras dividen el gráfico en cuatro cuadrantes según Cate y	

Nelson; las líneas punteadas indican el límite de detección del test rápido (LDT) y el nivel crítico tóxico (NCT) los que delimitan el rango cuantitativo de deficiencia vegetal (RDV) y el rango de consumo restringido (RCR). La intersección de las líneas enteras, surgidas del modelo CN, determina el nivel crítico óptimo (NCO).... 62

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Tanto los humanos como los animales, en especial los rumiantes, están expuestos a efectos negativos del nitrato (NO_3^-) cuando éste es ingerido en una proporción que supera los límites recomendados. Cuando se consume NO_3^- parte de éste genera metabolitos que pueden causar cáncer o metahemoglobinemia. Por esta razón mucha de la investigación se concentra en la acumulación de este ion en vegetales ya que ésta es una característica negativa de la calidad del vegetal desde el punto de vista nutricional (Blom-Zandstra, 1989). Además de los problemas de toxicidad, el NO_3^- en plantas es considerado un indicador del estatus nitrogenado de las mismas y por ende una herramienta adicional para manejar la fertilización nitrogenada de cultivos. Una manera de prevenir problemas de toxicidad así como de evaluar el grado de suficiencia de N del cultivo es conocer la concentración de NO_3^- en planta previo a su consumo. Debido a que la toma de decisiones en cultivos deber ser hecha lo antes posible, se requiere de un método rápido que indique la concentración de NO_3^- en la planta. En Uruguay las determinaciones de NO_3^- en plantas son realizadas mayormente utilizando tejido seco lo que implica un tiempo de secado que retrasa el dato de laboratorio. Reducir el tiempo entre la toma de muestra y el dato de laboratorio puede resultar en mayor eficiencia en el manejo del cultivo redundando en beneficios económicos y medio ambientales.

El presente trabajo de investigación constó de dos partes. La primera, abarcó el desarrollo de un test rápido de determinación de NO_3^- en jugo de tejido vegetal fresco (JTF). La segunda, se centró en conocer para nuestro sistema de producción los niveles característicos de NO_3^- en cultivos destinados tanto al consumo humano (lechuga, acelga y espinaca), como al de rumiantes (avena y raigrás) previo al primer pastoreo. Por tanto, el objetivo general fue desarrollar un test rápido de determinación de NO_3^- en planta y evaluar su sensibilidad para detectar cambios producidos por el agregado de N, así como estudiar su capacidad de discriminar entre situaciones de deficiencia y de exceso de N en plantas. Este estudio es relevante ya que a nivel

nacional existe muy escasa información publicada en relación a los contenidos de NO_3^- en plantas de hoja y en verdeos.

Esta tesis fue escrita en formato de artículo científico, siguiendo las especificaciones de la revista Agrociencia.

Nitrato en planta

El NO_3^- es una especie química que forma parte del ciclo del nitrógeno (N) y está presente en los alimentos ya sea naturalmente o como aditivo. Desempeña un papel importante en la nutrición y actividad de las plantas las que pueden acumularlo y bajo ciertas condiciones de crecimiento, alcanzar concentraciones elevadas (Havlin et al., 2005). Las principales fuentes de N inorgánico disponible para las plantas son el NO_3^- y el amonio (NH_4^+), siendo el NO_3^- la forma predominante en suelos bien aireados como consecuencia del proceso de nitrificación bacteriana. El movimiento del NO_3^- en el suelo hacia la superficie de las raíces es principalmente por flujo masal, por lo que la escasez de agua limita la absorción de este ion.

El NO_3^- presente en la solución del suelo es absorbido por las raíces y asimilado dentro de las células de la planta en una secuencia de tres pasos. (i) transporte a través de la membrana, (ii) reducción de NO_3^- a nitrito (NO_2^-) y de NO_2^- a NH_4^+ por la acción consecutiva de la NO_3^- reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR), (iii) asimilación del NH_4^+ en N orgánico produciendo glutamina y glutamato como los primeros compuestos orgánicos que distribuyen N a todos los otros metabolitos y macromoléculas que contienen N. Una vez dentro de la raíz el NO_3^- puede ser transportado hacia el apoplasto, transportado al xilema para su translocación hacia los tallos, reducido a NO_2^- por la enzima NR o almacenado en la vacuola. Seguidamente a la translocación a los tallos, el NO_3^- debe dejar el xilema y entrar al apoplasto en las hojas para alcanzar el mesófilo de éstas donde es nuevamente absorbido y reducido a NO_2^- o almacenado en la vacuola (Márquez et al., 2005).

Al NO_3^- se le asignan dos funciones. Además de la función específica como fuente de N para proteínas y aminoácidos tiene una función no específica como

osmótico vacuolar. En la célula, el NO_3^- es distribuido en dos pools, el pool metabólico ubicado en el citoplasma e incorporado en proteínas y el pool de almacenamiento ubicado en la vacuola, el cual no está disponible de forma inmediata. El NO_3^- acumulado en la vacuola depende de la intensidad de luz y de la disponibilidad de compuestos orgánicos para almacenar. Los ácidos orgánicos y los azúcares juegan un rol importante en la regulación osmótica ya que además de su función estructural, pueden ser almacenados como tales en la vacuola y por lo tanto afectarán la necesidad del NO_3^- como un osmolito. La luz especialmente, determina la producción y asimilación de carbohidratos (CH), (generando NADH e induciendo la enzima NR), así como también puede afectar la salida o entrada de NO_3^- a la vacuola. A bajas intensidades de luz la producción de compuestos orgánicos es baja debido a una baja tasa fotosintética y por lo tanto menor cantidad de CH estará disponible para ser almacenados en las vacuolas. El NO_3^- puede entonces, servir como una alternativa a los CH. Esto requiere menos gasto energético porque la absorción del ion, su transferencia a través del xilema y su almacenamiento en la vacuola no requieren tanta energía derivada de ATP, como lo requiere la producción y acumulación de compuestos orgánicos.

La intensidad de luz es, por lo tanto, un factor clave en determinar la concentración de NO_3^- en cultivos de hoja. En ese sentido trabajos desarrollados en Europa occidental indican que la diferencia en intensidad de luz entre meses triplicó las variaciones de la concentración de NO_3^- en lechugas (Van Eysinga, 1984). Cultivos invernales generalmente tienen mayores concentraciones de NO_3^- que cultivos de verano y cultivos del norte de Europa tienen mayor nivel de NO_3^- comparado con cultivos del sur (Weightman et al. 2006; AFFSA, 2007). Estas diferencias pueden ser explicadas por la mayor irradiación ocurrida en verano que tiende a reducir el NO_3^- en planta además de mayores tasas de crecimiento que coinciden con períodos de alta irradiación y temperaturas medias (Kanaan y Economakis, 1992).

Debido a que el NO_3^- es transportado exclusivamente por el xilema, cultivos de hoja como lechuga o espinaca tienen mayores concentraciones de este ion que frutos, semillas y órganos de almacenamiento como la papa (Blom-Zandstra, 1998). Durante el periodo 2000-2007 se llevó a cabo un relevamiento de las concentraciones de NO_3^- en especies vegetales cultivadas en 20 estados miembros de la UE y Noruega. Este estudio que abarcó distintos grupos de vegetales y 41969 resultados analíticos, reveló una gran variación en la concentración media de NO_3^- , desde 1 hasta 4800 $\text{mg NO}_3^- \text{kg}^{-1}$ de peso fresco (PF). Es de destacar que los vegetales de hoja entre los que se ubican la espinaca, la lechuga y la acelga tuvieron la media más alta de todos los grupos. El valor más alto registrado, 19925 $\text{mg NO}_3^- \text{kg}^{-1}$ de PF, perteneció a una variedad de lechuga (oak-leaf lettuce) cultivada bajo invernadero en Noruega. La variedad Butterhead de lechuga, frecuentemente utilizada en ensaladas, tuvo una concentración media apenas menor a 2000 $\text{mg NO}_3^- \text{kg}^{-1}$ de PF; además, sólo 2% de las muestras excedían los 4500 $\text{mg NO}_3^- \text{kg}^{-1}$ de PF. La media para espinaca estuvo en 785 $\text{mg NO}_3^- \text{kg}^{-1}$ de PF y por debajo del máximo nivel permitido con 5% de muestras que excedían los 3000 $\text{mg NO}_3^- \text{kg}^{-1}$ de PF (EFSA, 2008).

La acumulación de NO_3^- depende de otros factores ambientales además de la intensidad de luz como son la cantidad y forma del N aplicado, temperatura, agua del suelo y foto periodo. Los fertilizantes nitrogenados pueden contener N como NO_3^- , amonio o urea y otras formas las cuales una vez en el suelo serán convertidas a NO_3^- .

Nitrato en humanos y animales

Debido a los efectos perjudiciales que se le adjudican al NO_3^- tanto en animales como en rumiantes se han establecido pautas de concentración recomendable en alimento para ganado rumiante y de consumo en humanos. El antiguo Comité Científico sobre los Alimentos (Scientific Committee on Food, SCF) estableció para el NO_3^- una ingesta diaria aceptable (IDA) de 3,7 mg kg^{-1} de peso corporal, equivalente a 222 mg de NO_3^- al día en un adulto de 60 kg . Esta cantidad fue confirmada por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos

Alimentarios (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA) en el año 2002 (EFSA, 2008).

La exposición a NO_3^- en humanos es principalmente exógena como consecuencia del consumo de vegetales y, en menor medida, de agua y otros alimentos. El NO_3^- per se no es directamente tóxico, pero sus metabolitos o productos de reacción (óxido nítrico y nitrito, entre otros) son motivo de preocupación porque pueden tener efectos adversos para la salud, como la metahemoglobinemia y la carcinogénesis. El NO_3^- luego de ser ingerido es rápidamente absorbido por la parte superior del intestino (Spiegelhalder et al., 1976; Ellen et al., 1982; Bartholomew y Hill, 1984; Turek et al., 1980), sin llegar al intestino grueso. El NO_3^- absorbido es transportado por la sangre y secretado por las glándulas salivares. Aproximadamente el 25% del NO_3^- del plasma es tomado por las glándulas salivares, bioconcentrado alrededor de 10 veces y secretado en la saliva. En la boca se da la reducción bacteriana a nitrito de un 20% del NO_3^- en la saliva. En el estómago bajo condiciones ácidas el NO_2^- será transformado a óxido nítrico y otros metabolitos. La reducción del NO_3^- a NO_2^- en la boca es la más importante fuente de NO_2^- en humanos (70-80 %) (Stephany y Schuller, 1980). El pH de 1-2 en el estómago de humanos adultos es considerado muy bajo para el crecimiento de bacterias y consecuentemente para la reducción bacteriana del NO_3^- . Sin embargo, los bebés menores de tres meses son altamente susceptibles a la reducción bacteriana gástrica por tener muy poca producción de jugo gástrico (EFSA, 2008). La enfermedad conocida como “síndrome del bebé azul” o metahemoglobinemia infantil (Self y Waskom, 2008) es provocada cuando el NO_2^- absorbido en el torrente sanguíneo forma un complejo con la hemoglobina llamado metahemoglobina la cual provoca que los glóbulos rojos dejen de transportar oxígeno en la sangre

En el caso de los rumiantes, luego de la ingestión de forraje, el NO_3^- presente se reduce a NO_2^- y, finalmente, a NH_4^+ por los microbios del rumen. El NH_4^+ se convertirá, entonces, en proteína microbiana. Cuando el NO_3^- está presente en cantidades excesivas, se produce un superávit de NO_2^- , el que absorbido en el torrente

sanguíneo genera metahemoglobina por lo que el animal puede morir por asfixia a nivel celular. En realidad la toxicidad está dada por el NO_2^- pero es el resultado del exceso de NO_3^- en los forrajes y por lo tanto se la refiere a toxicidad por NO_3^- . La toxicidad por NO_3^- puede manifestarse en horas o puede tardar días en aparecer. Signos inespecíficos de toxicidad por NO_3^- incluyen pérdida de peso, disminución del apetito, diarrea, ojos vidriosos, abortos. Los síntomas de toxicidad aguda incluyen respiración trabajosa, temblores musculares, cianosis, colapso con coma y muerte dentro de las dos o tres horas siguientes. La toxicidad por NO_3^- puede ser confirmada postmortem por el color marrón-chocolate de la sangre después de las primeras horas de muerte (luego la sangre vuelve a su color normal).

La toxicidad es explicada por otros factores además del contenido de NO_3^- en los alimentos ya que se han reportado casos de muerte con niveles de NO_3^- bastante bajos en la dieta y también hay ejemplos donde los animales son alimentados con raciones altas en NO_3^- sin ningún daño (Shreve, 2002). Estos factores incluyen el estrés animal, la cantidad de forraje consumido, la rapidez con que come el animal, la parte de la planta consumida, la adaptación de los animales, la cantidad de grano suministrado y la concentración de NO_3^- del agua. Dietas con carbohidratos rápidamente metabolizables disminuyen la toxicidad de NO_3^- (Bedwell et al., 1995).

La concentración de NO_3^- en forrajes varía ampliamente habiéndose encontrado una media de 2200 mg N- $\text{NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS, y un rango desde 100 a 19000 mg N- $\text{NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS (Shreve, 2002). Los valores de concentraciones de NO_3^- en forraje considerados aptos para ser ingeridos por ganado por no causar toxicidad aguda o crónica varían según los autores. Wright y Davison (1964) consideran potencialmente tóxicos forrajes con 3400 – 4500 mg N- $\text{NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS, sin embargo, Shreve (2002) reporta valores superiores a 1400 mg N- $\text{NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS como potencialmente causantes de toxicidad aguda en rumiantes, mientras que Lyons et al. (1992) y Cash et al. (2002) sugieren, respectivamente, límites de 2000 y 2260 mg N- $\text{NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS.

Métodos de determinación de nitrato en plantas

El análisis de planta es una herramienta que permite conocer el estado nutricional o calidad de las plantas a ser consumidas. Los métodos de análisis de planta incluyen análisis en el laboratorio utilizando tejido seco y análisis rápidos (test) a partir del material vegetal fresco que permiten ser realizados en el campo (Havlin et al., 2005). Los métodos rápidos se basan en la extracción de jugo del tejido vegetal fresco (JTF), el cual normalmente se obtiene ejerciendo presión sobre alguna parte fresca de la planta (hojas, pecíolos, tallos). La determinación de NO_3^- en JTF se puede realizar por métodos potenciométricos estándar o con instrumentos portátiles (Rosen et al., 1996; Fontes et al., 2003; MacKown y Weik, 2004; Thompson et al., 2004). También hay disponibles métodos colorimétricos cualitativos como el Merckoquant Nitrate Tests (Hoel, 1999) o colorimétricos cuantitativos, como el Método de Cataldo para tejido fresco. La determinación de NO_3^- en JTF ha sido propuesta para decidir estrategias de pastoreo (O'Hara y Fraser, 1975; Lyons et al., 1992). También ha sido utilizada como herramienta de diagnóstico alternativa o complementaria al análisis de suelos para determinar el estatus nitrogenado y guiar las recomendaciones de fertilización en cultivos mediante la determinación de NO_3^- en alguna parte de la planta (Black, 1993).

II. DETERMINACIÓN RÁPIDA DE NITRATO EN JUGO DE TEJIDO FRESCO DE HORTALIZAS

ABREVIACIONES

CD NO_3^- , consumo diario máximo de NO_3^- recomendado para una persona de 70 kg de peso corporal; CD $\text{NO}_3^-_h$, consumo máximo diario recomendado de NO_3^- por persona (70kg) dado por el consumo de hortalizas; C-TF, colorimetría por nitración del ácido salicílico, en tejido fresco; C-TF transformado, valores de concentración de NO_3^- medidas por C-TF y transformadas a base seca; fMS, fracción promedio de materia seca; ID_nh, ingesta diaria de un número dado de hojas de hortaliza; MCR_ $\text{NO}_3^-_J$, máxima concentración recomendable de NO_3^- en jugo de lechuga; MCR_ $\text{NO}_3^-_S$, máxima concentración recomendable de NO_3^- en base seca; mhF, masa promedio en gramos de una hoja fresca de la hortaliza considerada; P-TS, potenciometría con electrodo de actividad específica para nitrato, en tejido seco.

RESUMEN

Se compararon los valores de NO_3^- obtenidos empleando una modificación en la extracción y determinación de la técnica colorimétrica de nitración del ácido salicílico en jugo de tejido fresco (C-TF), con los obtenidos por potenciometría con electrodo de actividad específica en tejido seco (P-TS), mediante análisis de regresión lineal y covarianza. Las especies utilizadas fueron acelga (*Beta vulgaris*), espinaca (*Spinacia oleracea*) y lechuga (*Lactuca sativa var. Capitata*). Para las tres hortalizas los coeficientes a y b no difirieron estadísticamente ($P < 0,05$). Al utilizar los datos de las tres hortalizas se obtuvo un $R^2 = 0,69$ y la medición por C-TF fue lineal en todo el rango de contenidos de NO_3^- (195 a 12225 mg kg^{-1} N- NO_3^-). Existió un error constante e independiente a cada determinación por C-TF de 85,45 mg L^{-1} N- NO_3^- . Los valores obtenidos por C-TF se transformaron a valores de NO_3^- en tejido seco (C-TF transformado), con el modelo de regresión previamente obtenido y la regresión entre C-TF transformado y P-TS no difirió de la relación teórica 1:1. Adicionalmente, se evaluó la utilidad del método C-TF para discriminar muestras con contenido de NO_3^- mayores o menores al valor de consumo máximo recomendado por la OMS. El error de aceptar muestras no recomendables osciló entre 0 y 19% y el de rechazar muestras aceptables entre 0 y 23%. Esto hace factible el uso de esta técnica para un rápido diagnóstico en centros de acopio de hortalizas.

Palabras clave: colorimetría, comparación métodos, nitración.

RAPID DETERMINATION OF NITRATE IN LEAF VEGETABLE FRESH JUICE

SUMMARY

Nitrate values determined by a modification in the extraction and determination of the colorimetric technique of nitration of salicylic acid in the juice of fresh tissue (C-FT), were compared with those obtained using the potentiometric method with specific activity electrode in dry tissue (P-DT) by linear regression analysis and covariance. The species used were beet (*Beta vulgaris*), spinach (*Spinacia oleracea*) and lettuce (*Lactuca sativa* var. *Capitata*). For the three vegetables a and b coefficients did not differ ($P < 0.05$). When using data from the three vegetables the R^2 was 0.69 and the measure with the method C-FT was linear across all NO_3^- content range (195 to 12225 $\text{mg N- NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS). There was a constant and independent error to each determination with C-FT of 85.45 mg L^{-1} N- NO_3^- . The values obtained by C-FT were converted to NO_3^- values in dry tissue (C-FT converted), using the previously obtained regression model. The regression between C-FT converted and P-DT did not differ from the 1:1 relation. Additionally, we assessed the usefulness of C-FT method to discriminate NO_3^- content in samples higher or lower maximum WHO recommended value. The error for accepting not advisable samples ranged from 0 to 19%, whereas the error for rejecting recommended ones ranges from 0 to 23%. Therefore, we consider feasible to use this technique for rapid diagnosis in vegetable collection centers.

Key words: nitration, colorimetry, method comparison

INTRODUCCIÓN

El consumo de NO_3^- por humanos ha sido tema de investigación en lo que refiere a posible toxicidad en lactantes y adultos al ingerir niveles potencialmente perjudiciales. Aproximadamente el 70 a 80% de la ingesta de NO_3^- en humanos proviene normalmente de los vegetales y entre el 10 y 15% del agua potable procedente de napas y ríos contaminados con NO_3^- (Klingenberg y Cristian, 1995; Elizondo, 2006).

La mayor parte del NO_3^- ingerido es excretado en la orina pero parte del mismo es reducido a nitrito (NO_2^-) en el intestino delgado. El NO_2^- al ser absorbido y transportado al torrente sanguíneo puede producir diferentes patologías cuando su concentración supera ciertos niveles críticos (Böckman et al., 1993). El NO_2^- oxida al hierro de la hemoglobina para formar metahemoglobina. Si más de un 10% de la hemoglobina se convierte en metahemoglobina, la capacidad de la sangre para transportar oxígeno disminuye y se desarrollan síntomas de anoxia (síntoma conocido como metahemoglobinemia) (Elizondo, 2006). En los últimos años se han descrito muchos casos de metahemoglobinemia en bebés y niños en relación a la ingesta de vegetales y agua con altos contenidos de NO_3^- (Alonso et al., 2007). En adultos, el riesgo del consumo de NO_3^- radica en la formación de nitrosaminas y nitrosamidas en el tracto digestivo, las cuales son potenciales agentes cancerígenos (Muro et al., 1998). Esta problemática llevó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a establecer una Ingesta Diaria Admisible de $3,7 \text{ mg dia}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ de peso de la persona (JECFA, 2002).

Usualmente las determinaciones de NO_3^- en planta se realizan en extracto de tejido seco debido a la confiabilidad y estabilidad de la medida. El método colorimétrico de nitración del ácido salicílico propuesto por Cataldo et al. (1975), presenta ventajas de rapidez y costo aún cuando se realiza utilizando tejido seco. En la publicación original sólo se trabajó con maíz (*Zea mays* L.) y avena (*Avena sativa* L.). Recientemente Valdés et al. (2004) evaluaron este método en lechuga y lo compararon con el método de destilación por arrastre con vapor considerado como de

referencia. Mantovani et al., (2005) lo evaluaron en alfalfa, y lo compararon con el método de la columna reductora de cadmio, habiéndose obtenido en ambos casos una alta correlación entre ambos métodos.

Los análisis que requieren extracto de tejido seco implican, sin embargo, la necesidad de secar la muestra, lo cual agrega un tiempo considerable de espera entre el muestreo y el resultado del análisis. Hallar un método rápido, confiable y de bajo costo para la determinación de NO_3^- , permitiría conocer el estado nutricional en lo que respecta a nitrógeno (N) en forma inmediata, facilitando la prevención del consumo por humanos de plantas con niveles no aceptables de este ion y la decisión de medidas de manejo como la fertilización nitrogenada. Diversos autores correlacionaron métodos rápidos de determinación de NO_3^- en jugo de tejido vegetal fresco con métodos de uso común en laboratorios como colorimétricos (MacKown, 2004), potenciométricos (Rosen, 1996; Riley et al., 1999; Thompson et al., 2004) o enzimáticos (MacKown, 2004) con variada sensibilidad, practicidad y costo. Ninguno de ellos evaluó, sin embargo, el método colorimétrico propuesto por Cataldo et al. (1995) en jugo de tejido vegetal fresco como forma rápida de determinar la concentración de NO_3^- .

Para realizar análisis químicos en el campo es conveniente que los procesos de extracción y determinación sean rápidos y de fácil implementación por lo cual se planteó la conveniencia de realizar una modificación en cada una de las dos etapas del Método de Cataldo et al. (1975) en jugo de tejido vegetal fresco. Los objetivos fueron: I) ensayar una modificación en la técnica de extracción y determinación de NO_3^- usando el método colorimétrico de nitración del ácido salicílico; II) evaluar el uso de esta herramienta para discriminar muestras obtenidas en el mercado con niveles de NO_3^- no aceptables para el consumo humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

El método colorimétrico propuesto por Cataldo et al. (1975) que utiliza tejido fresco (C-TF) se comparó con el método potenciométrico de electrodo de actividad específica para NO_3^- en tejido seco (P-TS). Este método potenciométrico fue el que arrojó la mayor correlación con el método de destilación por vapor (método de referencia) de entre otros tres evaluados en el trabajo publicado por investigadores argentinos (Valdés et al., 2004). Además es citado como método de referencia por la AOAC Internacional (Ross et al., 1996).

Las muestras de lechuga, espinaca y acelga ($n=26$, 18 y 22 respectivamente) se recolectaron en puestos de venta del Mercado Modelo de Frutas y Verduras. Cada muestra consistió de 36 hojas que se obtuvieron seleccionando la hoja más joven y completamente desarrollada de un total de 36 plantas tomadas al azar de un mismo productor. De cada muestra se obtuvieron dos sub-muestras cortando en sentido transversal al peciolo de tal manera que cada sub-muestra contuviera media hoja de cada una de las 36 originales.

Una sub-muestra se secó a 60 °C en estufa de aire forzado hasta alcanzar peso seco constante y luego se molió hasta pasar por malla de tamaño menor a 0,5 mm. La extracción de NO_3^- se realizó con agua a temperatura ambiente en una relación muestra/agua 1:100, excepto en muestras con concentraciones superiores a 10000 mg kg^{-1} N- NO_3^- tejido seco en las que se emplearon relaciones de dilución mayores. Esta solución se agitó durante una hora y se filtró con papel Whatman N° 2. La determinación potenciométrica se realizó con electrodo de actividad específica de NO_3^- (modelo 48680-00, Hach Co., Loveland, CO). Para la calibración del electrodo se utilizaron soluciones estándar de KNO_3 de 1, 10, 20, 40, 100 mg N L^{-1} . Se tomó 15 mL del extracto y se le agregó 10 mL de una solución buffer ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 6,7 g L^{-1} ; H_3PO_3 6 g L^{-1} ; Ag_2SO_4 10 g L^{-1} y NH_2HSO_3 9,5 g L^{-1}) para homogeneizar la fuerza iónica y eliminar interferencias (Gelderman y Beegle, 1998).

La otra sub-muestra fue sometida a maceración mecánica con prensa manual, y el jugo obtenido se filtró en papel Whatman N° 2 y se diluyó 10 veces con agua

destilada. El contenido de NO_3^- se determinó mediante una modificación del método de nitración del ácido salicílico para tejido fresco propuesto por Cataldo et al (1975). Las modificaciones realizadas fueron la no centrifugación del jugo posteriormente al filtrado y la utilización de NaOH 3,8 N en lugar de 1,9 N como se indica en el protocolo original. Se tomó una alícuota de 0,2 mL de muestra y se mezcló con 0,8 mL de ácido salicílico al 5% (m/v) en ácido sulfúrico. Luego de 20 minutos se le agregó 10 mL de NaOH 3,8 N. Según estos autores, las mediciones de NO_3^- deben ser corregidas por el valor de absorbancia del blanco de la muestra, que serían interferencias. La absorbancia del blanco se determinó utilizando el mismo procedimiento pero agregando ácido sulfúrico puro en lugar de la mezcla ácido salicílico-ácido sulfúrico. Una vez cuantificadas las absorbancias de las soluciones y descontada la del respectivo color del blanco, se estimó el contenido de NO_3^- a partir de una curva de calibración de soluciones de concentración conocidas (0,5, 10, 40, 100, 200 mg L^{-1} N- NO_3^-) preparadas a partir de una solución concentrada estándar de 2000 mg L^{-1} de N- NO_3^- .

La comparación de ambos métodos se realizó mediante análisis de regresión lineal donde se consideró al contenido de NO_3^- de tejido seco como variable independiente (x) y al contenido en tejido fresco como variable dependiente (y). Para verificar que el ajuste de la curva fuera independiente de la especie, se realizó un análisis de covarianza utilizando el PROC GLM del SAS (SAS Institute, 1990). En este análisis se ajustó la regresión $y: f(x)$ con datos de dos especies y se utilizó la tercera como covariable. Se verificó la distribución normal de los residuales mediante la rutina Proc VAR Normal (SAS Institute, 1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las tres especies existió relación lineal positiva ($P < 0,001$) entre las determinaciones C-TF y P-TS ($R^2 = 0,64, 0,74$ y $0,65$ con $n = 26, 18$ y 22 para lechuga, espinaca y acelga, respectivamente). A pesar de haberse utilizado especies diferentes, los coeficientes a y b de los respectivos modelos no fueron estadísticamente diferentes ($P < 0,05$) de acuerdo al análisis de covarianza realizado. Por lo tanto la comparación entre los métodos C-TF y P-TS se realizó integrando los valores de las tres especies.

Al considerar todos los datos, existió relación lineal positiva entre C-TF y P-TS, con $R^2 = 0,69$ y $P < 0,05$ (Figura 1), y tanto la pendiente ($b = 0,04$) como el intercepto ($a = 85,45$) fueron diferentes de cero ($P < 0,001$ en ambos parámetros). Thompson et al. (2004), encontraron relación lineal del tipo ($a + bx$) al relacionar la concentración de NO_3^- medida en savia de la base del tallo de cebada (con el método de Cardy Meter) y NO_3^- en tejido seco (con electrodo de actividad específica). Sin embargo, Rattin et al. (2004) ajustaron un modelo cuadrático – plateau al comparar concentraciones de NO_3^- en jugo y en tejido seco de pecíolo de papa. Estos investigadores encontraron que la metodología que utilizaron para determinar NO_3^- en jugo de pecíolo perdió linealidad a valores mayores de $20000 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de tejido seco. A partir de ese valor límite no hubo relación entre ambos métodos. Sin embargo, en nuestro trabajo, la concentración de NO_3^- determinado en jugo de tejido fresco y extracto de tejido seco, vario linealmente en todo el rango de concentraciones medidas alcanzando un valor máximo en extracto de tejido seco de 12225 mg kg^{-1} de N-NO_3^- .

Las determinaciones de NO_3^- en extracto de tejido seco explicaron el 69% de la variación de NO_3^- en jugo de tejido fresco. Valores similares fueron reportados por Sims et al. (1995) evaluando el estado nutricional en maíz, por Thompson et al. (2004) al investigar en dos variedades de cebada cervecera ($R^2 = 0,72$ y $0,82$) y por Riley et al. (1999) al comparar determinaciones de NO_3^- en tejido seco y savia de la base del tallo en dos variedades de trigo duro ($R^2 = 0,76$ y $0,60$).

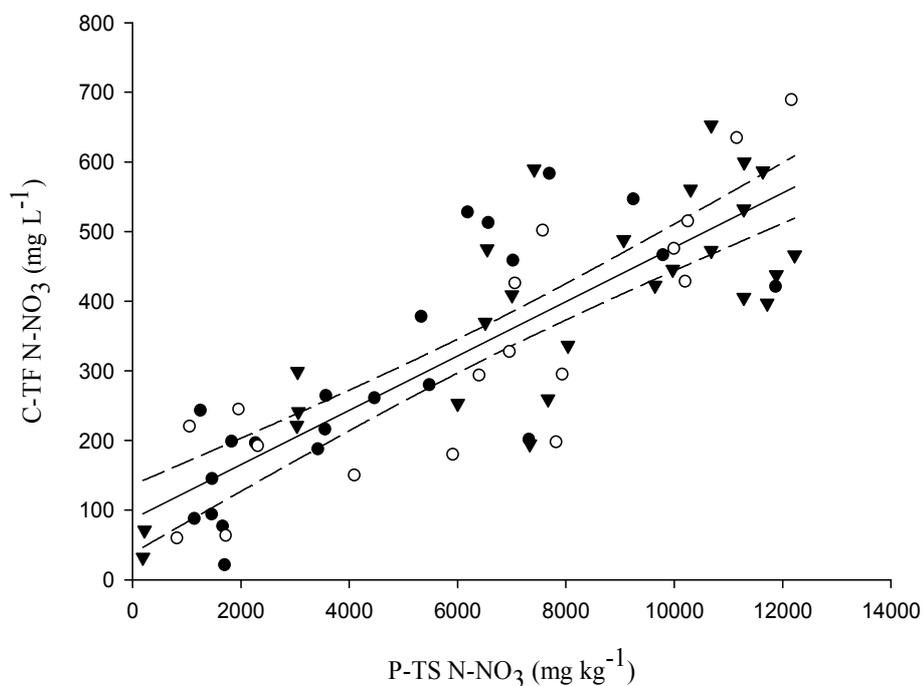


Figura 1. Relación entre la concentración de NO_3^- medida por colorimetría (y) y potenciometría (x) para las tres especies (acelga, espinaca y lechuga). El método calorimétrico fue el de nitración del ácido salicílico en jugo de tejido fresco (C-TF) y el potenciométrico fue el del electrodo de actividad específica en extracto de tejido seco (P-TS). Los círculos y rectángulos negros representan, a las muestras de acelga y lechuga, respectivamente y los círculos vacíos representan a las muestras de espinaca. La línea central representa el modelo ajustado ($y = 0,04x + 85,45$, $R^2 = 0,69$); y las líneas negras discontinuas límites de confianza al 95%.

Al ser el valor del parámetro a diferente de cero, podemos sugerir que existió una fuente de error constante en las determinaciones realizadas en jugo de tejido fresco. Por lo tanto, hubo desarrollo de color debido a reacciones diferentes a la de nitración del ácido salicílico y dicha interferencia no pudo ser eliminada por la cuantificación del color del blanco sugerida por Cataldo et al. (1975).

Los valores de NO_3^- en jugo de tejido fresco se transformaron a valores de NO_3^- en tejido seco (C-TF transformado) utilizando el modelo de regresión lineal C-TF en función de P-TS que incluyó todos los datos (figura 1), de acuerdo a lo

sugerido por Thompson et al. (2004), para comparar ambos métodos con la misma unidad de medición (Figura 2). El coeficiente de regresión no fue estadísticamente diferente de 1 ($b= 0,99$, $P<0,01$) y el intercepto no fue diferente de cero ($a = -4,08E-13$). En consecuencia, este modelo no difirió de la línea teórica 1:1, por lo que sugerimos que el NO_3^- medido en la extracción de tejido seco y fresco correspondieron al mismo pool de NO_3^- en la planta, concordando con lo sugerido por Thompson et al. (2004).

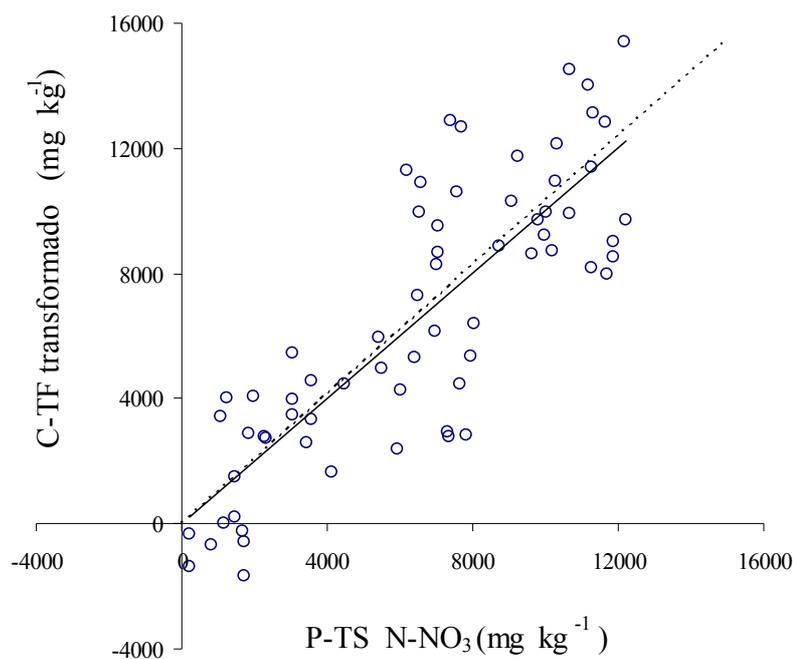


Figura 2. Relación entre la concentración de NO_3^- medida por colorimetría (y) y potenciometría (x) para las tres especies (acelga, espinaca y lechuga). El método colorimétrico fue el de nitración del ácido salicílico en jugo de tejido fresco (C-TF), y los valores obtenidos fueron luego transformados a base seca (C-TF –transformado) con el modelo determinado previamente. El método potenciométrico fue el del electrodo de actividad específica en extracto de tejido seco (P-TS). La línea llena representa el modelo ajustado ($y = -4,08E-13 + 0,99x$) y la línea punteada indica la relación 1:1.

Los residuales (P-TS - C-TF transformado) tuvieron distribución normal ($W=0,978$, $P<W=0,537$); y no mostraron ninguna tendencia al ser graficados en función del valor P-TS (Figura 3) por lo que no hubo errores ligados al valor de análisis.

Con esta transformación existieron, sin embargo, diferencias de entre 14 y 5440 mg kg^{-1} de N-NO_3^- entre las medidas C-TF y P-TS, para el rango de concentraciones de NO_3^- encontradas en el jugo de tejido fresco, lo que se corresponde con diferencias relativas de 0,9 y 74% del valor de P-TS, respectivamente.

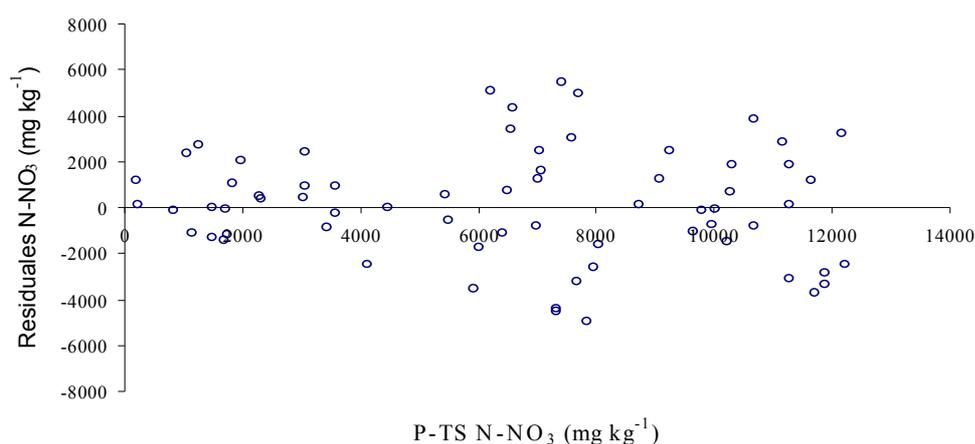


Figura 3. Relación entre los residuales (y) y la concentración de NO_3^- medida por potenciometría con electrodo de actividad específica para NO_3^- en tejido seco, P-TS (x). Los residuales representan la diferencia entre el contenido de NO_3^- medido por P-TS menos el contenido de NO_3^- medido por colorimetría por nitración del ácido salicílico en tejido fresco y transformado a base seca, C-TF –transformado.

La relación funcional de la Figura 1 si bien resulta útil para comparar cuantitativamente los resultados de ambos métodos, no indica el grado de error asociado al utilizar el método colorimétrico en jugo para discriminar muestras con valores excesivos de aquellas con valores aceptables de concentración de NO_3^- en hoja. La UE estableció valores de concentración límites para lechuga de 2500, 3500 o 4500 $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de PF, según el sistema de producción y estación del año, (EFSA,

2008). Si bien los valores obtenidos en nuestro trabajo estuvieron por debajo de esos límites, esto no implica que el consumidor esté exento de riesgo de superar el consumo máximo de NO_3^- recomendado por la OMS (JECFA, 2002). Por consiguiente, se definieron niveles críticos basados en este criterio. El procedimiento empleado para establecer este nivel crítico requirió entonces asumir un consumo de hojas de hortalizas dado y se siguieron las siguientes etapas. Primero se estimó el consumo diario máximo de NO_3^- recomendado para una persona de 70 kg de peso corporal (CD NO_3^-), según la OMS (JECFA, 2002), el cual correspondió a un valor de 58,60 mg N- $\text{NO}_3^- \text{ día}^{-1}$. Se asumió además, que el 70% de la ingesta total diaria de NO_3^- proviene del consumo de verduras (European Commision, 1995), entonces, el consumo diario máximo recomendado de NO_3^- aportado por hortalizas ($\text{CD NO}_3^-_h$) sería 41,02 mg N- $\text{NO}_3^- \text{ día}^{-1}$. Sin embargo, este valor se puede alcanzar consumiendo pocas o muchas hojas de hortalizas dependiendo de la concentración de NO_3^- de las mismas. Este número de hojas (ID_{nh}) se puede estimar con la formula [1]

$$\text{ID}_{nh} = \frac{\text{CDNO}_3^-_h \times 1000}{\text{NO}_3^-_{PS} \times \text{mhF} \times \text{fMS}} \quad [1]$$

donde:

mhF es la masa promedio en gramos de una hoja fresca de la hortaliza considerada, fMS es la fracción promedio de materia seca de la hoja y $\text{NO}_3^-_{PS}$ es la concentración de NO_3^- en base seca (mg kg^{-1} de N- NO_3^-) en las hojas.

Se realizó la estimación de la ID_{nh} considerando valores de concentración de NO_3^- extremos y sólo para lechuga, por ser la hortaliza que comúnmente se consume fresca. Los valores de mhF y de la fMS considerados fueron 13 y 0.053g¹ respectivamente. Una concentración alta de NO_3^- , 11134 mg N- $\text{NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS, valor por debajo del cual se ubica el 75% de los datos (Tercer cuartil) arroja una ID_{nh} de 5 sin que se supere el $\text{CD NO}_3^-_h$. Si por el contrario, tomamos el valor de

¹ Beretta, A. 2009. Niveles de nitrato en hortalizas de hoja en Uruguay: valores típicos, rangos de variación y evaluación de metodológicas de determinación (sin publicar).

concentración de NO_3^- correspondiente al Primer cuartil, $6385 \text{ mg N- NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS (por debajo del cual se encuentran el 25% de los datos), entonces la ID_{nh} que aportaría el $\text{CD NO}_3^-_{\text{h}}$ sería 23.

En este trabajo se tomó como ejemplo una ID_{nh} de 5 por considerarse una cantidad de lechuga normalmente ingerible por un período prolongado y se seleccionó el valor $11134 \text{ mg N- NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS como valor crítico correspondiente a la máxima concentración de NO_3^- en tejido seco ($\text{MCR}_{\text{NO}_3^-}_{\text{S}}$).

Para estimar el valor correspondiente a la máxima concentración recomendable de NO_3^- en jugo de lechugas ($\text{MCR}_{\text{NO}_3^-}_{\text{J}}$), el valor correspondiente al $\text{MCR}_{\text{NO}_3^-}_{\text{S}}$ se superpuso a la relación funcional entre la concentración de NO_3^- en tejido seco, P-TS (x) y jugo de tejido fresco, C-TF (Figura 4). El valor de la estimación resultó en 505 mg L^{-1} .

Los dos valores de $\text{MCR}_{\text{NO}_3^-}$ en base seca y jugo (11134 mg kg^{-1} y 505 mg L^{-1} N- NO_3^- , respectivamente), se utilizaron para delimitar cuatro cuadrantes, los que se superpusieron a la relación entre estos dos métodos de análisis (Figura 4). El conteo de las muestras comprendidas dentro de cada cuadrante permite analizar el error del método rápido al clasificar muestras como aceptables y no aceptables en relación al método P-TS. Los puntos comprendidos en el Cuadrante III corresponden a las muestras clasificadas como aceptables y los incluidos en el Cuadrante IV a las clasificadas como no aceptables, por ambos métodos. En el Cuadrante I, en cambio, el método C-TF rechazaría muestras que serían aceptadas por el método P-TS, mientras que en el Cuadrante II aceptaría muestras que no serían aceptadas por el método P-TS.

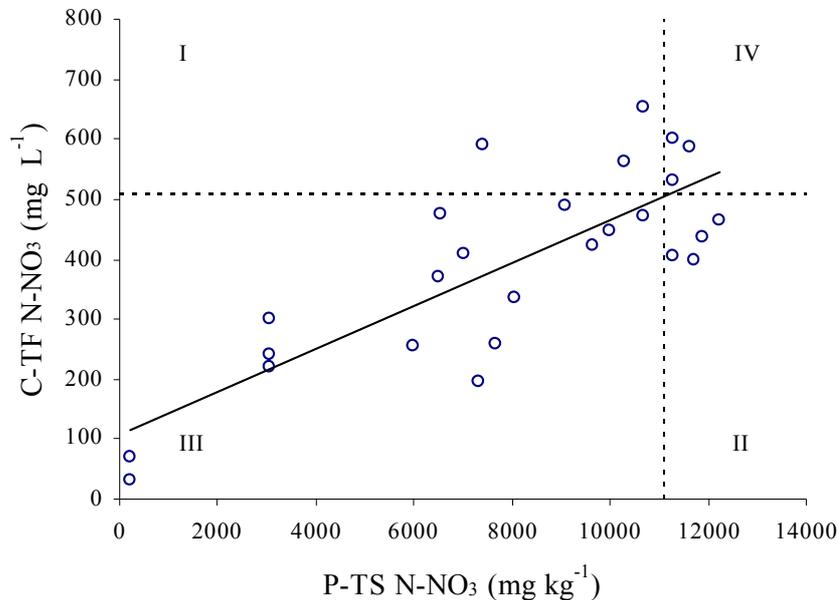


Figura 4. Relación entre la concentración de NO_3^- medida por colorimetría (y) y potenciometría (x) en muestras de lechuga. El método colorimétrico fue el de nitración del ácido salicílico en jugo de tejido fresco (C-TF) y el potenciométrico fue el del electrodo de actividad específica en extracto de tejido seco (P-TS). La línea negra entera representa la función: $y = 0,036x + 108,87$, $R^2 = 0,64$. El Cuadrante I contiene los puntos que representan muestras con concentraciones de NO_3^- aceptables según el método P-TS pero inaceptable según C-TF; el Cuadrante II contiene valores aceptables según C-TF pero inaceptables según P-TS, de acuerdo al límite propuesto. Los Cuadrantes III y IV representan las muestras aceptadas y rechazadas, respectivamente, por ambos métodos. La delimitación de los cuadrantes se basó en un consumo diario de 5 hojas de lechuga por persona.

Utilizando como base un consumo de 5 hojas, el 11,5% de las muestras se localizaron dentro del Cuadrante I, y 15,4% dentro del Cuadrante II. Sin embargo, si asumimos que la ingesta máxima diaria de NO_3^- se alcanzara consumiendo 8 hojas de lechuga, los porcentajes serían 7,7% y 3,8% para los Cuadrantes I y II, respectivamente (datos no mostrados). Para la salud humana, es preferible disminuir el error en el Cuadrante II, ya que se aceptarían muestras que son potencialmente nocivas, mientras que el error del Cuadrante I implica que el método de C-TF rechazaría muestras con concentraciones de NO_3^- aceptables según el método de P-

TS. El máximo error del método rápido fue de 19% (puntos en el Cuadrante II) y 23% (puntos en el Cuadrante I).

Estos resultados indican, por consiguiente, que el error asociado a usar el método rápido para rechazar hortalizas con niveles adecuados de NO_3^- no superó el 23%. Este error podría ser aceptable, al menos en aquellos centros de distribución o acopio donde no se realizan actualmente medidas de control, ya que la pérdida de exactitud se compensaría con los bajos costos y la rapidez de análisis, lo que permitiría replicar muestras dudosas.

CONCLUSIONES

La determinación del contenido de NO_3^- mediante C-TF se relacionó linealmente con las determinaciones de NO_3^- por C-TS, tanto en acelga, espinaca o lechuga. Al ser similares las relaciones lineales entre ambos métodos, un único modelo fue adecuado para representar esta relación para las tres hortalizas. Pese a su relativa imprecisión, el método de análisis de NO_3^- en jugo de tejido fresco (C-TF) sería una herramienta aceptable para identificar lechugas u otras hortalizas no recomendables para el consumo humano, porque al ser una técnica rápida y de bajo costo permitiría repetir el análisis de muestras con concentraciones elevadas.

BIBLIOGRAFÍA

Alonso, L.; Gutiérrez, M.L.; Canduela, V.; Hernández, M; Tazón, M. y Pérez, L.A.

2007. Metahemoglobinemia en una lactante por consumo de puré vegetal.

Emergencias 2007; 19:283-285.

Böckman, O.; Kaarstad, O. and Richards, I. 1993. Agricultura y fertilizante.

Fertilizantes en perspectiva. 2ª. Noruega, Ostlands- Posten. 265 p.

Cataldo, D.; Haroon, M.; Schrader, L and. Youngs, V. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Communications Soil Science Plant Analysis 6:71-80.

- Elizondo, J. 2006. El nitrógeno en los sistemas ganaderos de leche. *Agronomía Mesoamericana*. 17(1):69-77.
- European Commission: Scientific Committee for Food. 1995. Opinion on nitrate and nitrite. Annex 4 to Document III/. 5611/95, pp. 1-25.
- Fontes, P.C.; Coelho, E.L. and Cardoso, A.C. 2003. Petiolo sap nitrate and leaf nitrogen critical values in melon plants grown in heated greenhouse and field conditions. *Journal of plant nutrition* 26:1403-1411.
- Gelderman, R.H. and Beegle, D.1998. Nitrate-nitrogen. p. 17-20. In: Recommended chemical soil test procedures for the north- central region. NCR Publication No. 221. Missouri Agricultural Experiment Station, Columbia, MO, USA.
- Geraldson, C.M. and Tyler. K.B. 1990. Plant analysis as an aid in fertilizing vegetable crops.546-562 p. In D. E. Kissel. ed. Westerman R. L. (ed.) *Soil Testing and Plant Analysis*. SSSA, Madison, WI.
- Hoel, B.O. 1999. Determination of nitrogen status in winter wheat by measuring basal stem tissue sap nitrate concentration. *Acta Agric. Scand., Sect. B Soil and Plant Sci.* 49:82-91.
- J.E.C.F.A. 2002. Evaluation of certain food additives. Fifty-ninth report of the Joint FAO/WHO. Expert Committee on Food Additives. World Health Organization, Geneva. 26-32 pp.
- Klingenberg, A. y Cristian, A.1995. Comportamiento de las concentraciones de nitrato y nitrito en lechuga (*Lactuca sativa* var. *Crispa* (L)) bajo condiciones de fertilización nitrogenada y otros ensayos de cosecha y poscosecha. Tesis Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 52p
- MacKnown, T.C. and Weik. J. C. 2004. Forage & Grazing Lands. Comparison of laboratory and quick-test methods for forage nitrate . *Crop Sci.* 44:218-226.
- Mantovani, R.J.; Pessoa da Cruz, M.C.; Ferreira, M.E. e Barbosa, J. C. 2005. Comparacao de nitrato em tecido vegetal. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 40:53-59.

- Muro, J.; Irigoyen, H. I. y Lamsfus, C. 1998. Avances en el metabolismo del nitrógeno. De la fisiología a la biología molecular. 1ª. España. 453-463 p.
- Rattin, J.E.; Giletto, C.M y Echeverria, H.E. 2004. Comparación de métodos de determinación de nitrato en pecíolos de cultivares de papa. RIA. 33:117-134.
- Riley, E.A.; Thompsom, T.L.; White, S. A. and Ottman, M.J. 1999. Developing sap nitrate tests for durum wheat and barley. [On line]. University of Arizona. Collage of Agriculture. Disponible en <http://ag.arizona.edu/pub/crops/az1147/>
- Ross, P.F. 1996. Veterany analytical toxicity. 14 p. 5. En: P. Cunniff (ed) Official methods of analysis of AOAC International: Agricultural chemicals; Contaminants; Drugs. 16th ed. (I) AOAC International. Gaithersburg, Maryland.
- Rosen, C.J.; Errebhi, M. and Wang, W. 1996. Testing petiolo sap for nitrate and potassium: A comparison of several analytical procedures. HortScience. 31:1173-1176.
- SAS Institute, 1990. SAS/STAT user's guide. Version 6. 4th ed. Vol. 1. SAS Inst., Cary, NC.
- Sims, T.; Vasilas, B.; Gartley, K.; Milliken, B. and Green, V. 1995. Evaluation of soil and plant nitrogen tests for maize on manured soils of the atlantic coastal plain Agron. J. 87:213-222.
- Thompson, T.T; Ottman, M.J. and Riley-Saxton, E. 2004. Basal stem nitrate test for irrigated malting barley. Agron. J. 96:516-524.
- Valdes, A.; Marti, L.; Filippini, M.F. y Salcedo, C. 2004. Determinación de nitratos en vegetales. Comparación de cuatro métodos analíticos. FCA UNCuyo. XXXVI (1): 21:28.

III. TEST RÁPIDO DE NITRATO COMO INDICADOR DEL ESTATUS DE NITRÓGENO EN GRAMÍNEAS FORRAJERAS

ABREVIACIONES

BT, base de tallo; CT, modelo Cate y Nelson; ETS, extracto de tejido seco; JTF, jugo de tejido fresco; LDT, Límite de detección del test; LP, modelo lineal-plateau; NCO, nivel crítico óptimo; NCT, nivel crítico tóxico; PE, planta entera; RDV, rango de deficiencia vegetal; PL, modelo plateau-lineal; rango cuantitativo de deficiencia vegetal; RCR, rango de consumo restringido; RR, rendimiento relativo.

RESUMEN

Raigrás (*Lolium multiflorum*) y avena (*Avena sativa*) son verdes ampliamente utilizados en sistemas lecheros de Uruguay; normalmente se fertilizan con N a la siembra y luego de cada pastoreo. En períodos de déficit de forraje, estas gramíneas pueden causar intoxicación y muerte en rumiantes, debido al potencial de acumular altas concentraciones de NO_3^- . Los objetivos fueron: i) conocer los niveles de nitrato (NO_3^-) en cultivos comerciales de estos verdes antes del primer pastoreo; ii) desarrollar un test rápido de determinación de NO_3^- en jugo de tejido fresco (JTF) y iii) identificar rangos de NO_3^- en JTF que permitan distinguir situaciones de deficiencia y exceso de N en planta. Durante el otoño de 2005 se tomaron muestras de plantas de cultivos comerciales de avena y raigrás y de ensayos de raigrás de respuesta a N. Se determinó el NO_3^- en extracto de tejido seco (ETS) y JTF por el método propuesto por Cataldo et al. (1975). A este método se le aplicó una modificación para la determinación en JTF (test rápido). La relación entre NO_3^- en ETS y JTF para BT y PE fue descrita por un modelo plateau-lineal (PL) ($R^2 > 0,90$). Se relacionó rendimiento relativo (RR) y NO_3^- en JTF (BT) y se identificó un rango cuantitativo de deficiencia vegetal (RDV) y de consumo restringido (RCR). Tanto en planta entera (PE) como en BT se detectaron concentraciones de NO_3^-

tóxicas para rumiantes en algunas situaciones. El test rápido permitiría detectar cultivos aptos para ser consumidos en forma restringida, que hayan o no alcanzado el máximo RR, ya que el límite de detección estuvo por debajo del nivel crítico tóxico (NCT).

Palabras clave: exceso nitrógeno, raigrás, toxicidad rumiantes.

RAPID NITRATE TEST AS AN INDICATOR OF NITROGEN STATUS IN FORAGE GRASSES

SUMMARY

Ryegrass (*Lolium multiflorum*) and oat (*Avena sativa*) annual pastures are widely used in dairy production in Uruguay; they are normally fertilized with N at sowing and after each grazing. In times of shortage of forage, these grasses can cause poisoning and ruminants death due to its potential to accumulate high NO_3^- concentration. The objectives were: i) to know NO_3^- levels in these crops before being grazed for the first time ii) develop a quick test for determining NO_3^- in juice of fresh tissue (JFT) and iii) to identify ranges of NO_3^- in JFT that discriminate N deficiency from N excess in plants. During the autumn of 2005 oat and ryegrass plant samples were collected from commercial farms and research trials. The NO_3^- concentration was quantified in dry tissue extract (DTE) and in JFT by the method proposed by Cataldo et al. (1975). A modification of this method to determine NO_3^- in JFT was applied (quick test). The relationship between NO_3^- in DTE and JFT in BS and whole plant (WP) was described by a plateau- lineal (PL) model ($R^2 > 0.90$). Relative yield was related (RR) to NO_3^- in JFT (BT) and ranges of quantitative plant deficiency (RDV) and restricted consumption (RCR) were identified. Both WP and BS contained toxic NO_3^- concentrations for ruminants. The quick test would detect suitable crops for ruminants animals consumption, having or not reached the

maximum RR, since the detection limit was below the critical toxic level (CTL).
However, in any circumstance, pasture must be included as part of its whole diet.

Key words: nitrogen excess, ryegrass, ruminant toxicity

INTRODUCCIÓN

Los verdes invernales raigrás (*Lolium multiflorum*) y avena (*Avena sativa*) son ampliamente utilizados en sistemas de ganadería intensiva en Uruguay. El agregado de nitrógeno (N) es esencial para aumentar el rendimiento de estos verdes por lo que normalmente se fertilizan con N a la siembra (marzo-abril) y luego de cada pastoreo. Sin embargo, además de aumentar el rendimiento, el N puede causar problemas de toxicidad en rumiantes y por lo tanto las cantidades a agregar como fertilizante deben lograr un balance entre el rendimiento óptimo y el contenido de nitrato (NO_3^-) en planta.

Al igual que otras gramíneas, estas especies acumulan N en sus tejidos en forma de ion NO_3^- . Esta capacidad es favorecida por factores que disminuyen la demanda de N, como la baja intensidad de luz o deficiencia de fósforo, o que aumentan la oferta del mismo, como la fertilización con N o la mineralización de la materia orgánica (MO) (Gul y Kolp, 1960; Crawford et al., 1961; Baker y Tucker, 1971; Mieres y La Manna, 2008). Luego de prolongados períodos de sequía se puede producir una alta disponibilidad de NO_3^- por la mineralización de la MO, favoreciendo la acumulación de este ion especialmente si las plantas están en los primeros estadios de crecimiento en donde los requerimientos de N son bajos (Alexander, 1980). Crawford et al. (1961) reportaron contenidos de NO_3^- en plantas de avena cada vez menores al avanzar en los estadios de crecimiento. En un momento dado, dentro de una misma planta, los tallos y especialmente la parte basal y entrenudos acumulan más NO_3^- que otras partes (Maynard, 1976).

En rumiantes, el consumo de plantas con alto contenido de NO_3^- aumenta el riesgo de intoxicación aguda o crónica por este ion, si bien el grado de toxicidad depende de los microorganismos del rumen, edad del animal, y de las condiciones y cantidad de forraje consumido, entre otros (O'Hara y Fraser, 1975; MacKown y Weik, 2004). El NO_3^- ingerido en bajas cantidades es reducido por los microorganismos del rumen a NO_2^- y luego a NH_4^+ cualquier exceso de este último es excretado por la orina. Sin embargo, cuando se ingieren altos niveles de NO_3^- parte de

éste pasa al torrente sanguíneo como NO_3^- y NO_2^- . El NO_2^- oxida al hierro (Fe II) de la hemoglobina formando metahemoglobina reduciendo la capacidad de transportar oxígeno de la sangre causando problemas crónicos de performance como disminución del apetito, ganancia de peso y producción de leche.

La concentración de NO_3^- en planta a partir de la cual el consumo se considera posible causante de toxicidad aguda y muerte en bovinos varía según distintos autores. Lyons et al. (1992) y Cash et al. (2002) sugieren, respectivamente, límites de 2000 y 2260 mg N- NO_3^- kg^{-1} de materia seca (MS). Backer et al. (1971) y Shreve y Miller (2002) citan como potencialmente tóxico contenidos de NO_3^- mayores a 2100 y 1400 mg N- NO_3^- kg^{-1} de MS, respectivamente. Lyon et al. (1992) reportaron la muerte de bovinos luego de consumir plantas de raigrás con concentraciones entre 2608 y 3798 mg N- NO_3^- kg^{-1} de MS. En Uruguay, si bien se han constatado muertes por intoxicación con nitrato, la mayoría de estos eventos no han sido reportados (Mosca et al., 2006). Pigurina y Banchemo (1992) denunciaron problemas de toxicidad en el departamento de Colonia, sucedidos luego del período de sequía que azotó al país en el otoño de 1992. Mieres y La Manna (2008) señalaron que en ese año la extrema sequía acentuó los problemas que se presentaron en el otoño del 92 en la zona del litoral sur del país la cual afectó un alto número de productores. En ninguno de estos casos se reportaron niveles de NO_3^- del forraje consumido por los animales intoxicados.

Se hace necesario, entonces, conocer la concentración de NO_3^- de los verdeos como forma de evitar una disminución en la performance animal o muerte del ganado. La cuantificación de este ion en planta ha sido mayormente evaluada utilizando tejido seco y diversos métodos analíticos. Bremner y Keeney (1965) propusieron el método de destilación por arrastre con vapor como método de referencia mientras que otros autores han utilizado como referencia el método colorimétrico que utiliza la columna reductora de cadmio (MacKown y Weik, 2004; Mantovani et al., 2005). Cataldo et al. (1975) propusieron un método colorimétrico por nitración con ácido salicílico para la determinación de NO_3^- (en adelante Método

de Cataldo) en extracto de tejido seco (ETS). Valdés et al. (2004) y Mantovani et al. (2005) reportaron una alta correlación entre los valores de NO_3^- determinados por el Método de Cataldo y los métodos de referencia mencionados.

El tiempo que transcurre entre la toma de la muestra vegetal y la obtención del resultado en el laboratorio, puede hacer variar considerablemente la concentración de NO_3^- en la planta debido al crecimiento del cultivo, condiciones climáticas y de manejo, entre otros (Lyons et al., 1992). Esta demora en conocer el valor analítico de NO_3^- está básicamente dada por el tiempo de secado del tejido vegetal, proceso que normalmente dura 48 horas, y por la extracción de NO_3^- del mismo, y no por la técnica de determinación aplicada. Las técnicas de extracción reportadas en la bibliografía son significativamente diferentes y dependen del método analítico de determinación (Anderson y Case, 1999). Estas técnicas, además, se presentan con variantes como tamaño de muestra, volumen de extracción, tiempo de agitado, temperatura de extracción y pH de la solución extractante.

Los métodos rápidos se basan en la extracción de jugo del tejido vegetal fresco (JTF), el cual normalmente se obtiene ejerciendo presión sobre alguna parte fresca de la planta (hojas, pecíolos, tallos). El JTF es comúnmente mal llamado “savia” y está compuesto por líquido apoplásmico, savia, citosol y líquido vacuolar (Gaviola y Lipinski, 2002). La determinación de NO_3^- en JTF se puede realizar luego por métodos potenciométricos estándar o con instrumentos portátiles tales como los introducidos por las compañías Horiba Lda. (Kyoto, Japan) y la Hach Company (Loveland, Colo.) conocidos como Cardy Ion- NO_3^- Meter y Hach meter, respectivamente (Rosen et al., 1996; Fontes et al., 2003; MacKown y Weik, 2004; Thompson et al., 2004). También hay disponibles métodos colorimétricos cualitativos con bandas reactivas específicas, como el Merckoquant Nitrate Tests (Hoel, 1999) o colorimétricos cuantitativos, como el Método de Cataldo para tejido fresco.

La determinación de NO_3^- en JTF ha sido propuesta para decidir estrategias de pastoreo (O'Hara y Fraser, 1975; Lyons et al., 1992). También ha sido utilizada como herramienta de diagnóstico alternativa o complementaria al análisis de suelos para

determinar el estatus nitrogenado y guiar las recomendaciones de fertilización en cultivos mediante la determinación de NO_3^- en alguna parte de la planta (Black, 1993). Thompson et al. (2004) utilizaron la concentración de NO_3^- en JTF en la base de tallos (BT) como indicador del estatus nitrogenado en cebada cervecera. García (2005) considera que la determinación rápida de NO_3^- en JTF en la BT de maíz en estadios tempranos de crecimiento (V4-7) permite evaluar la nutrición nitrogenada del cultivo y corregir inmediatamente la potencial deficiencia de este nutriente. Hoel (1999) utilizó la determinación de NO_3^- en JTF de BT para predecir el estatus nitrogenado de plantas de trigo.

La determinación de NO_3^- en suelo no es un buen indicador de la disponibilidad de N para el cultivo cuando éste está en activo crecimiento debido a que en esas condiciones la concentración de NO_3^- en el suelo es generalmente muy baja, ya que la planta absorbe la mayor parte del N mineralizado. En el caso de forrajes, con varios cortes o pastoreos, la determinación de NO_3^- en planta previo al primer corte o pastoreo, es una herramienta más eficiente para conocer el estatus de N en las plantas y distinguir situaciones de deficiencia de N a corregir en el próximo corte, de situaciones de exceso de N en planta. El conocer la deficiencia o el exceso de N es especialmente importante en estos verdeos que se fertilizan normalmente después de cada corte o pastoreo.

La determinación de la concentración de NO_3^- presente en la base de tallos (BT) de estos verdeos, cobra especial interés en condiciones de pastoreo, especialmente cuando no hay otra oferta de forraje. Por lo tanto se plantean los siguientes objetivos: i) conocer para nuestro sistema de producción los niveles característicos de NO_3^- en cultivos comerciales de *Avena sativa* y *Lolium multiflorum* previo al primer pastoreo; ii) desarrollar un test rápido de determinación de NO_3^- en JTF y iii) determinar rangos de NO_3^- en JTF de plantas que permitan distinguir entre situaciones de deficiencia y exceso de N en plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el año 2005 se tomaron muestras de plantas de raigrás y/o avena de 27 cultivos comerciales y de siete ensayos de respuesta al agregado de N de raigrás tetraploide, (*L. multiflorum*). La totalidad de los sitios (n=34) estaban ubicados en la cuenca lechera, en los departamentos de Colonia, San José y Canelones.

Características de los experimentos

En este trabajo se utilizaron ensayos de respuesta a la fertilización nitrogenada con objetivos diferentes a los de este estudio. Estos ensayos se instalaron aproximadamente a los 20 días después de la siembra, y cuando las plantas tenían 5 cm de altura. La siembra se realizó en la última quincena de marzo en los sitios 1, 3, 4 y 6 y en la primera quincena de abril en los sitios 2, 5 y 7. Los tratamientos fueron tres dosis de N como urea (0, 40 y 80 kg N ha⁻¹) aplicados al voleo, usando un diseño experimental de bloques completos aleatorizados con tres repeticiones, con parcelas de 16 m². Los suelos dominantes estaban comprendidos dentro de los grandes grupos Argiudolls, y Hapludols (Durán et al., 2006). Excepto por los tratamientos con N, las demás prácticas de manejo fueron las que el productor normalmente realiza.

Muestreo de suelos

Previo a la instalación de los ensayos se tomaron muestras compuestas de suelo de cada bloque, a una profundidad de 0-20 cm. Las muestras se secaron a 40°C y se molieron hasta pasar por malla de 2 mm. El carbono orgánico se determinó por oxidación húmeda en medio ácido sin aplicación de calor externo (Walkley y Black, 1934). El P lábil se determinó por Bray-1 (Bray y Kurtz, 1945). Las bases intercambiables fueron extraídas con acetato de amonio bufereado a pH 7 (Thomas, 1982) y determinado por fotometría de llama (K) o espectrometría de absorción atómica (Ca, Mg). Se determinó N- NO₃⁻ por colorimetría (540 nm) luego de la reducción de NO₃ a NO₂⁻ a través de una columna de cadmio (Reacción de Griess-Ilosvay; Mulvaney, 1996). El pH se determinó en KCl 1 M y en agua por el método

potenciométrico. En el Cuadro1 se presentan algunas propiedades químicas de los suelos utilizados. Un segundo muestreo de suelos para cuantificar NO_3^- fue realizado simultáneamente al muestreo de plantas que se llevó a cabo previo al primer pastoreo o corte.

Cuadro 1. Propiedades químicas de los suelos de los ensayos de raigrás (*L.multiflorum*).

Sitio	Ubicación	Fecha de muestreo	pH _(H2O)	pH _(KCl)	M.O†	K	Ca	Mg	N-NO ₃ ⁻	P-Bray ⁻¹
1	34°35'05.01"S 56°42'49.92"O	8/04/05	6,4	5,0	3,5	0,6	20,7	7,7	4,8	8,5
2	34°38'8.88"S 55°51'5.83"O	20/04/05	5,7	4,6	4,1	0,8	11,7	4,5	8,1	10,9
3	34°18'54.80"S 56°54'51.73"O	08/04/05	5,4	4,5	5,3	0,8	18,5	3,5	40,1	15,8
4	34°32'38.17"S 56°46'50.76"O	08/04/05	6,1	5,2	5,1	0,7	18,8	3,7	25,9	45,9
5	34°03'29.20"S 57°15'49.73"O	06/05/05	7,0	5,9	4,8	0,7	38,2	2,9	46,4	38,8
6	34°30'10.65"S 56°49'56.60"O	08/04/05	5,8	4,7	3,8	0,6	11,4	3,5	18,6	22,5
7	34° 7'32.10"S 56°44'06.36"O	20/04/05	5,8	4,7	3,7	0,6	7,6	2,8	2,4	9,6

† Materia orgánica

En los 27 predios de cultivos comerciales de los cuales no se especifica su ubicación, no se realizó muestreo de suelo por lo que no se dispone de datos de propiedades químicas de los mismos.

Recolección de muestras vegetales, extracción y determinación de nitrato

La recolección de plantas (parte aérea) se realizó principalmente en horas de la mañana. Posteriormente se almacenó en heladera hasta su procesamiento en las siguientes 24 hs. En los 27 sitios sin tratamiento de N se recolectaron sólo muestras de planta entera (PE), las que se subdividieron en dos partes, una de las cuales se secó para obtener ETS y la otra se prensó para obtener la muestra de JTF. En los 7 sitios de ensayos se recolectaron muestras de BT y en 5 de éstos, de BT y PE. La recolección de PE y BT en estos 5 sitios sólo se realizó en las dosis de 0 y 80 kg N ha⁻¹.

El procedimiento para obtener ETS fue el siguiente: primero se secó la muestra de PE o BT en estufa a 60°C hasta peso constante y luego se la molió hasta pasar por malla de 1mm. Se agitaron 0,5g de tejido seco en agua desionizada por 1 hora en una proporción tejido seco: agua desionizada de 1:40 a 1:160 a temperatura ambiente (22 °C) (Mantovani et al., 2005). La solución resultante se filtró con papel Watman N°2 y se congeló en freezer hasta su análisis. El JTF se obtuvo comprimiendo el tejido fresco con una prensa hidráulica de acero inoxidable y almacenando el mismo en freezer hasta su análisis. Previo al análisis del NO₃⁻ en el JTF, éste se diluyó con agua desionizada (1:2-10).

El NO₃⁻ presente en el ETS se determinó por el Método de Cataldo (método de laboratorio). Este método se basa en la formación de un complejo por nitración del ácido salicílico en un medio altamente ácido. La máxima absorbancia del complejo se da a 410 nm en medio básico (pH>12) y ésta es directamente proporcional a la cantidad de NO₃⁻ presente. Alícuotas de 0,2 mL de jugo se mezclaron con 0,8 mL de ácido salicílico al 5% (m/v) en H₂SO₄ concentrado (H₂SO₄-AS). Luego de 20 min se agregó 20 mL de NaOH 1,9 N y se dejó enfriar hasta que la temperatura de la muestra alcanzara temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia a 410 nm. Se

realizó la lectura de un blanco cada quince muestras. Los resultados de este análisis se expresaron en $\text{mg N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS.

El NO_3^- presente en el JTF también se determinó por el Método de Cataldo para muestra fresca que difiere del anterior en que debido a la pigmentación del jugo de tejido vegetal fresco se debe utilizar un blanco por muestra. Este método fue modificado en este trabajo, ya que el jugo no se centrifugó posteriormente al filtrado y se utilizó 10 mL de NaOH 3,8 N (test rápido). Los resultados de este análisis se expresaron en $\text{mg N- NO}_3^- \text{ L}^{-1}$.

Metodología de determinación de niveles críticos y análisis estadístico

En los sitios con ensayos de respuesta al N, los valores de rendimiento relativo (RR) del cultivo se correlacionaron con las concentraciones de NO_3^- en JTF de BT. Cabe señalar que los datos de rendimiento de MS fueron tomados de Casanova et al. (2007). Se trabajó con el RR por ser una expresión de respuesta de rendimiento que elimina parte del efecto de las variables del sitio de la respuesta del cultivo a la fertilización. El RR representa el rendimiento de las parcelas no fertilizadas expresado como porcentaje del rendimiento máximo (R_{max}) y se calculó como el rendimiento de la parcela con cero N (T_0) de cada bloque sobre el R_{max} del bloque correspondiente, multiplicado por cien. La relación RR vs NO_3^- en JTF se ajustó utilizando el modelo Plateau- lineal (PL), y el gráfico de Cate y Nelson (CN). A partir del ajuste del modelo PL y del gráfico CN se determinaron los niveles críticos óptimos (NCO) de NO_3^- en JTF correspondientes a cada relación. La concentración crítica óptima del gráfico CN es la que minimiza los puntos en los cuadrantes superior izquierdo e inferior derecho y para el modelo segmentado (PL) es aquella en donde se juntan los dos segmentos del modelo. El término “niveles críticos” en este trabajo se utilizó para separar situaciones de deficiencia y exceso de N en las plantas al momento del corte, y no para guiar recomendaciones de fertilización. En el gráfico de CN se identificó un rango cuantitativo de deficiencia vegetal (RDV) cuyo límite inferior corresponde al límite de detección del test rápido (LDT) y el superior al

NCO. Entre el NCO y el valor máximo de concentración de NO_3^- sugerido por Cash et al. (2002) como de toxicidad aguda y muerte (nivel crítico tóxico, NCT), se definió el rango de consumo restringido (RCR).

Los valores de concentración de NO_3^- en ETS y JTF se compararon mediante análisis de regresión usando las herramientas del software Microsoft Excel (Microsoft Inc., 1997). Para verificar la hipótesis de una mayor concentración de NO_3^- en BT respecto a PE de una misma muestra se realizó una comparación de medias apareadas, utilizando la prueba t disponible en Excel. El modelo PL (no lineal) se ajustó por métodos numéricos utilizando la herramienta Solver del software de Microsoft Excel 1997 (Microsoft Inc., Redmond, WA). La determinación del NC del gráfico CN se realizó con un macro programado en Visual Basic para aplicaciones de Microsoft Excel 1997 (Microsoft Inc., Redmond, WA). Se realizó un análisis de varianza con los datos de rendimiento de MS de cada sitio y entre sitios usando el procedimiento GLM del paquete estadístico del SAS (SAS Institute, 1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Riesgo de intoxicación en bovinos y nitrato en plantas

Concentración de NO_3^- en tejido seco para planta entera y base de tallos

Las concentraciones de NO_3^- para todos los sitios e independientemente de la especie y tratamiento ($n=90$) estuvieron en el rango de 0 a 7365 y de 0 a 12470 mg $\text{N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS para PE y BT, respectivamente. En ambas porciones de planta se encontraron concentraciones de NO_3^- en ETS que superaron el límite considerado como de toxicidad aguda y muerte según los niveles citados por Backer et al. (1971), Lyon et al. (1992), Briann et al. (2002) y Cash et al. (2002). Al relacionar la concentración de NO_3^- en BT en función de PE de una misma muestra, se confirmó que las concentraciones en BT fueron mayores a las de PE, de acuerdo a lo señalado por Maynard (1976). La relación fue lineal positiva con $R^2 = 0,78$ y pendiente $b=1,68$ (Figura no mostrada).

Para la discusión de los datos obtenidos se tomó la clasificación propuesta por Cash et al. (2002) por ser la más detallada y conservadora. Ésta incorpora cuatro rangos de concentraciones de NO_3^- (de aquí en adelante clases) en forraje: menores a 350 mg $\text{N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS (primera clase) que incluye plantas con valores recomendables para ser consumidas por todas las categorías de bovinos; entre 350 y 1130 mg $\text{N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS (segunda clase), plantas aptas para ser consumidas por bovinos no preñados; entre 1132 y 2260 mg $\text{N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS (tercera clase), aptas para ser consumidas en forma restringida por bovinos no preñados, y mayor a 2260 mg $\text{N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS (cuarta clase), no aptas para ningún rumiante.

Al analizar las concentraciones de NO_3^- en PE de los cultivos comerciales de avena y raigrás y de los testigos de cinco ensayos ($n=39$) que recibieron N sólo a la siembra, se encontró que 33, 31, 20 y 15% de las muestras pertenecían a la primera, segunda, tercera y cuarta clase, respectivamente. Dentro de las muestras de PE que recibieron además del N a la siembra, 80 kg N ha^{-1} a los dos semanas de sembrado,

provenientes sólo de los ensayos ($n=15$), se encontró que el 7 y 46% pertenecían a la primera y segunda clase; y el 20 y 27% se clasificaron dentro de la tercera y cuarta clase, respectivamente. El efecto de la fertilización con N a los 20 días originó, por tanto, cambios en la distribución de muestras por clase, pasando de 35 a 47% la proporción de muestras con recomendación de consumo restringido o no consumo.

Al analizar las concentraciones de NO_3^- en BT de las muestras correspondientes a los testigos de los ensayos, se encontró que 37, 10, 21 y 32% de las muestras pertenecían a la primera, segunda, tercera y cuarta clase, respectivamente. Dentro de las muestras de BT con agregado adicional de 80 kg N ha^{-1} de N, se encontró que 9 y 24% pertenecían a la primera y segunda clase; y el 29 y 38% se clasificaron dentro de la tercera y cuarta clase, respectivamente. El efecto de la fertilización con N originó, al igual que en el caso de PE, cambios en la distribución de muestras por clase afectando principalmente la primera clase que disminuyó fuertemente como en PE.

Todas las muestras con concentraciones en planta (PE y BT) en la cuarta clase procedían de tres sitios (3, 4 y 5) que presentaron altos valores de NO_3^- a la siembra (Cuadro 1). La alta acumulación en planta se explicó en parte por los altos niveles de NO_3^- en suelo, provenientes además de la fertilización con N, de la mineralización de la MO, proceso acentuado por el déficit hídrico en el mes de marzo (Figura 1a y 1b). En Uruguay, años muy lluviosos en el periodo otoño-invierno favorecerán la ocurrencia de pérdida de nitrógeno; sin embargo, años secos favorecerán la acumulación de N mineral en los suelos a través del proceso de mineralización del humus y restos vegetales (Perdomo, 1997). De todas maneras, el total anual de precipitación del 2005 (1158 mm) alcanzó valores similares al promedio anual de la serie histórica 1972-2002 (1131 mm), (INIA, 2005). A su vez en la Figura 1a, se observa que en el trimestre abril-junio del año 2005 se registraron precipitaciones superiores a los valores promedio del trimestre. La alta disponibilidad de agua durante el período de crecimiento abril y mayo, previo al primer corte (Figura 1a y 1b), habría favorecido el transporte del NO_3^- en el suelo dado que éste llega a las

raíces mayormente por flujo masal. Los resultados obtenidos dejan en evidencia que para las condiciones ambientales atmosféricas y de suelo en que se desarrolló este estudio, existió acumulación de NO_3^- en planta hasta niveles perjudiciales para el ganado.

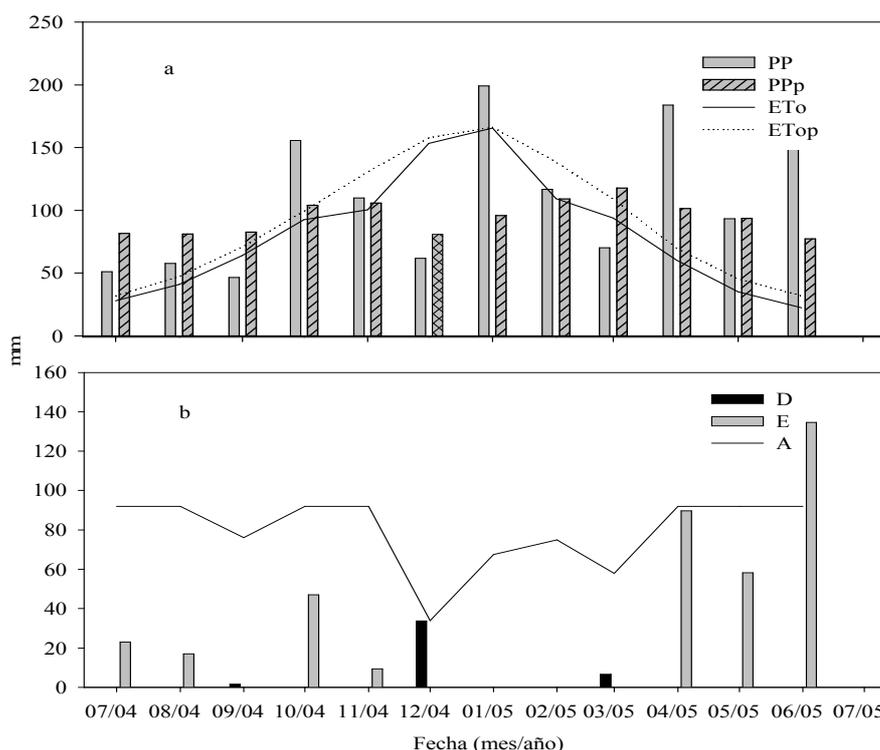


Figura 1. a) Precipitación mensual del año 2004/2005 (PP), promedio de precipitación mensual de la serie histórica 1972-2002 (PPp), evapotranspiración de referencia mensual del año 2004/2005 (ETo) y ETo climática mensual (ETop), promedio del período 1975-2006, (INIA. Unidad GRAS INIA Las Brujas, 2005); b) déficits (D), excesos hídricos (E) y almacenajes (A), para el suelo con menor lámina de agua disponible (92 mm), (Molfino y Califra, 2001), del período julio 2004 a junio 2005.

Concentración de nitrato en jugo de tejido fresco para planta entera y base de tallos

Las concentraciones en JTF variaron entre 0 y 696 y entre 0 y 950 $\text{mg N-NO}_3^- \text{L}^{-1}$ en PE y BT, respectivamente. Al igual que lo observado en ETS, los valores promedio en BT resultaron mayores a los de PE de la misma muestra (217 vs 158 mg

N-NO₃ L⁻¹, $P < 0,05$). La relación entre las concentraciones de NO₃⁻ en JTF de BT y PE fue lineal positiva, con $R^2 = 0,93$ y $P < 0,05$ (Figura 2). La pendiente ($b=1,30$) fue diferente de cero ($P < 0,05$) y mayor a uno, lo que confirma que en las condiciones de estos ensayos la concentración de NO₃⁻ en BT fue mayor que la de PE. Pese a esta relación general encontrada utilizando 27 muestras, siete mostraron la tendencia opuesta, es decir mayores valores en PE que en BT. En estos siete casos, sin embargo, las concentraciones de NO₃⁻ fueron muy bajas lo que significa que el nutriente estaría siendo metabolizado y por lo tanto no acumulado. Las buenas condiciones ambientales previas al muestreo habrían favorecido el crecimiento e incrementado el nivel de demanda de NO₃⁻ de la parte aérea de la planta y descendido el de la BT, parte con potencial de acumular más NO₃⁻ que otras. Además, en el momento del muestreo de plantas, los suelos correspondientes a las parcelas de estos sitios presentaron valores bajos de NO₃⁻, entre 3 y 4,5 y sólo una de ellas alcanzó los 7 mg kg⁻¹. Otra causa de las diferencias encontradas en nuestro estudio podría ser variaciones en la hora del día en que se tomó la muestra. Black (1993) reportó variaciones de NO₃⁻ en planta, en varios cultivos, causadas por este efecto, citando como ejemplo altas concentraciones de NO₃⁻ en BT de maíz temprano en la mañana pero no tarde en el día. Variaciones en el estadio fisiológico de las plantas al momento del muestreo, también pueden generar diferencias en el contenido de NO₃⁻ acumulado, ya que los estadios más avanzados de madurez implican mayores requerimientos de N, y por lo tanto, menor acumulación de NO₃⁻ en BT.

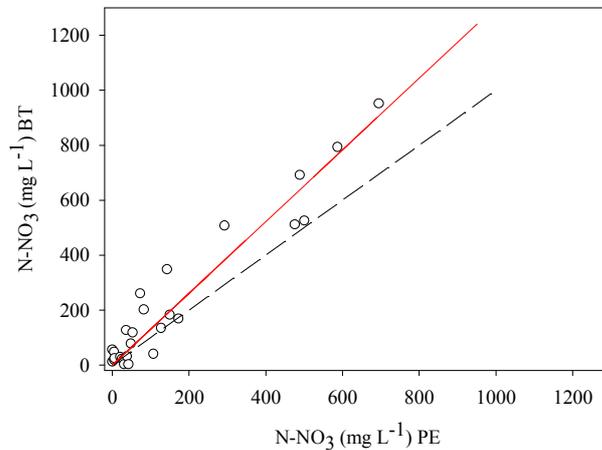


Figura 2. Relación entre la concentración de NO_3^- en tejido fresco en la base de tallos (BT) (y) y en planta entera (PE) (x) de la misma muestra, determinado por el método colorimétrico por nitración del ácido salicílico en jugo de tejido fresco. La línea entera representa la función: $y = 1,30x$, $R^2 = 0,92$, y la línea punteada indica la relación 1:1.

Relación entre la concentración de nitrato en tejido seco y fresco para planta entera y base de tallos

La relación encontrada entre la concentración de NO_3^- en ETS (x) y JTF (y) para BT y PE fue descrita por un modelo plateau-lineal (PL) (Figura 3a y 3b). En ambos modelos la variación de concentración de NO_3^- en el JTF fue explicada por la variación de concentración de NO_3^- en ETS en más de un 90%.

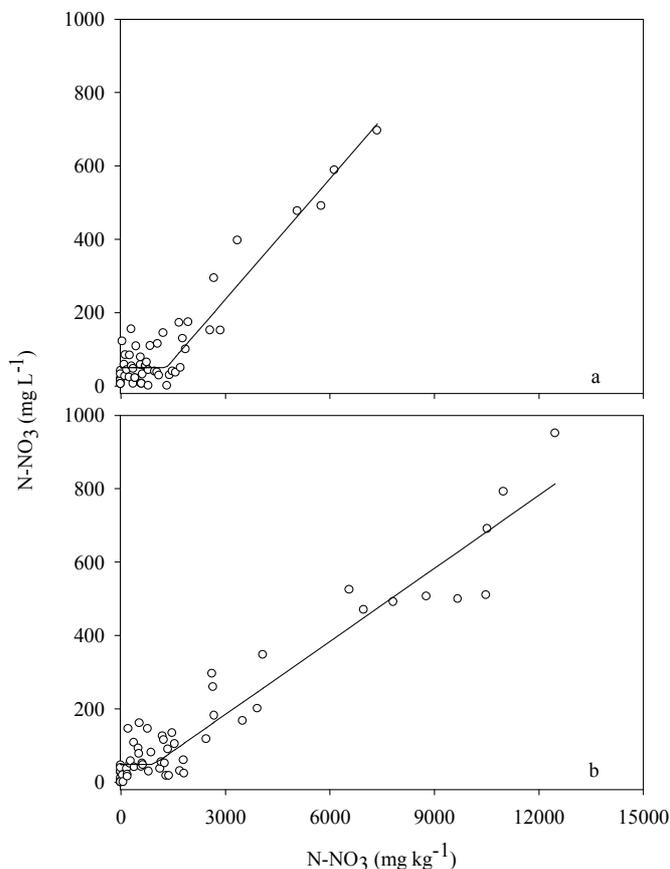


Figura 3. Relación entre la concentración de NO_3^- en jugo de tejido fresco (y) y en tejido seco (x) de plantas de avena y raigrás. a) en planta entera, b) en la base de tallos. La línea representa el modelo plateau-lineal (PL), a) MAX (-93,2 + 0,11x, 50), $R^2 = 0,91$, b) MAX (-14 + 0,066x, 49), $R^2 = 0,92$.

En los modelos, la linealidad comenzó a partir de 1302 y 950 $\text{mg N-NO}_3^- \text{kg}^{-1}$ MS para PE y BT, respectivamente (Figura 3a y 3b). A partir de estos valores la medición en JTF fue sensible a variaciones en la concentración de NO_3^- en ETS, tanto para mediciones en PE (Figura 3a) como para BT (Figura 3b). Por debajo de estos límites, las determinaciones en JTF no detectaron, en forma cuantitativa, variaciones en las concentraciones de NO_3^- en ETS. Thompson et al. (2004) encontraron una relación lineal significativa entre JTF y ETS en BT de plantas de cebada cervecera utilizando un método potenciométrico rápido para determinar NO_3^- en JTF. Lyons et

al. (1992) trabajando con raigrás también encontraron una relación lineal positiva entre NO_3^- en ETS y JTF. Riley et al. (1999) correlacionaron valores de NO_3^- en JTF obtenidos con un Cardy meter, método potenciométrico, con valores de NO_3^- en ETS de trigo duro y cebada encontrando coeficientes de determinación (R^2) de 0,72 y 0,60, respectivamente.

La buena correlación encontrada en este trabajo entre ambos métodos permitiría transformar los valores de NO_3^- en JTF a valores de NO_3^- en ETS, como lo sugiere Thompson et al. (2004). Sin embargo, Echeverría et al. (2001) al relacionar la concentración de NO_3^- en BT de plantas de maíz en V6 en JTF y ETS encontraron que la pendiente era diferente entre años y por lo tanto a pesar de la alta correlación encontrada ($R^2 = 0,90$) no fue posible definir una única relación, por lo cual no recomiendan transformar unos valores en otros. Estos autores encontraron que la concentración de NO_3^- en JTF fue función de la concentración de NO_3^- en el suelo, de la radiación incidente y de la humedad del suelo. Esta última fue mencionada como posible causa de las diferentes pendientes entre años. Dado que Thompson et al. (2004) trabajaron con un mayor número de datos y que las pendientes en el trabajo de Echeverría et al. (2001) tienen valores similares (0,82 y 0,87 para el año 1997 y 1998, respectivamente) se tomó la recomendación del primero.

Al transformar los valores de NO_3^- en jugo a valores de NO_3^- en ETS se observó que los valores en (y) del plateau de las ecuaciones de los modelos en las Figuras 3a y 3b (50 y 49 mg N- $\text{NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ para PE y BT, respectivamente) se correspondieron con los valores 1302 y 950 mg N- $\text{NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS, respectivamente. Éstos fueron los niveles mínimos de NO_3^- detectables en ETS por el test rápido.

El valor de 1302 mg N- $\text{NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS en PE, a partir del cual el test rápido comenzó a detectar incrementos en la concentración de NO_3^- en tejido seco cayó en el rango de 1130-2260 mg N- $\text{NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS. Alimentos con estas concentraciones de NO_3^- son permitidos para alimentar ganado que no esté en gestación, pero en forma restringida al 25-50 % de su ración. Cuando sólo se dispone

de mezcla de gramíneas con concentraciones superiores a $1000 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS, Mieres y La Manna (2008) sugieren como medidas adicionales a tener en cuenta, ofrecerle a los animales alguna fuente de carbohidratos solubles (maíz, sorgo o afrechillo) antes del pastoreo o evitar el mismo si el animal está hambriento permitiendo el consumo de estas gramíneas tarde en el día. Si consideramos la clasificación propuesta por Cash et al. (2002), el test rápido no detectaría alimentos aptos para ganado preñado ya que para esta categoría se recomienda el consumo de pasturas con niveles inferiores a $350 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS, concentración inferior al nivel plateau.

A pesar de que el método rápido fue sensible a partir de concentraciones altas, tendría gran utilidad para el productor ya que el rango superior de concentraciones que detectó es el más crítico en cuanto al efecto económico inmediato, pues abarca valores considerados de toxicidad aguda y muerte para los animales.

Rendimiento de materia seca de forraje al primer corte y determinación de niveles críticos

Respuesta del raigrás al agregado de nitrógeno

Los valores de rendimiento de MS de los ensayos de raigrás (Casanova et al., 2007) determinados al primer corte presentaron un rango muy amplio, variando desde 43 a 2859 kg ha^{-1} de MS. Según INASE (2005), el rendimiento promedio en los ensayos de registro de cultivares de esta especie fue $1467 \text{ kg MS ha}^{-1}$, menor al máximo encontrado en los ensayos de este trabajo pero mayor al rendimiento promedio ($1042 \text{ kg MS ha}^{-1}$).

Como era de esperar, la fertilización con N postsiembra incrementó el rendimiento ($P < 0,05$) en la mayoría de los sitios (cinco de siete). En sólo dos, el tratamiento con 80 kg N ha^{-1} superó al rendimiento con 40 kg N ha^{-1} . Al considerar el promedio de todos los sitios sin embargo, se encontró respuesta hasta el agregado de

80 kg N ha⁻¹ (Cuadro 2). En los dos sitios donde existió respuesta hasta la dosis de 80 kg ha⁻¹ de N, esta se podría explicar por los bajos contenidos de NO₃⁻ disponibles a la instalación de los ensayos siendo éstos de 4,8 y 2,4 mg de N-NO₃⁻ kg⁻¹ de suelo. Según Casanova et al. (1997) valores inferiores a 5 mg de N-NO₃⁻ kg⁻¹ de suelo implican una dependencia casi total en verdes como raigrás y avena, de la fertilización nitrogenada. Los sitios en donde no se observaron diferencias significativas entre las dosis de N, presentaban niveles de NO₃⁻ muy superiores a los sugeridos por Casanova et al. (1997), excepto en el Sitio 2, que presentó 8,1 mg kg⁻¹ de suelo. Este sitio, sin embargo, tenía un relativamente alto contenido de materia orgánica que, al mineralizarse, podría haber suministrado una cantidad importante de N. A partir de trabajos posteriores de Casanova et al. (2007) con variedades de raigrás tetraploides, de mayor productividad que las diploides, se propuso una zona límite de respuesta a la fertilización nitrogenada de 16 a 18 mg N-NO₃⁻ kg⁻¹ de suelo por encima de la cual no habría aumento de rendimiento.

Cuadro 2. Rendimiento de materia seca para los tratamientos con N¹ y promedio para cada sitio de los ensayos de raigrás. Resultado del efecto de aplicación de N (ANAVA y contrastes ortogonales) para cada sitio.

Sitio	Dosis de N-Urea			Media	Efecto N	Contrastes	
	0	40	80			0 vs. resto	40 vs. 80
———— Rend (kg ha ⁻¹) ————				———— Prob > F ————			
1	872	1018	1570	1153	0,0420	0,0595	0,0419
2	561	843	1051	819	0,0324	0,0180	0,1445
3	2172	2486	2859	2506	0,0553	0,0388	0,1219
4	592	885	947	808	0,0549	0,0234	0,5877
5	671	1310	1147	1042	0,0316	0,0140	0,3494
6	287	794	635	572	0,2370	0,1223	0,5636
7	43	415	721	393	0,0011	0,0007	0,0085
Media	743	1107	1276	1042	0,0001	0,0001	0,0155

Niveles de nitrato en base de tallos

La relación entre RR y la concentración de NO₃⁻ en JTF de BT en los sitios con ensayos de respuesta al N, donde cada punto representa un bloque, fue la esperada (Figura 4). El NCO varió con el modelo, siendo menor en el gráfico CN que en el modelo PL (89 y 122 mg N-NO₃⁻ L⁻¹, respectivamente).

Las concentraciones críticas surgidas del gráfico CN y del modelo LP separaron claramente dos zonas que describen el estatus de N en el cultivo al momento del primer corte: una zona de deficiencia de N donde hay aumento del RR al aumentar la concentración de NO₃⁻ en JTF de BT y otra donde el RR no aumenta a valores mayores de NO₃⁻ en planta. Las muestras por debajo del NC presentarían mayor deficiencia que las que superaron este valor. Estas últimas, al no alcanzar el

¹ Tomado de Casanova et. al 2007.

100% de RR, también estarían deficientes en N. Por lo tanto, para esta situación, el NC estaría separando zonas con requerimientos de dosis de N diferenciales.

Esta figura no incluyó, sin embargo, tres puntos correspondientes a dos sitios, que mostraron muy bajos porcentajes de RR (32, 36 y 46%) a pesar de tener, respectivamente, muy altos valores de NO_3^- (524, 181 y 950 $\text{mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$). Este resultado podría deberse a posibles deficiencias de otro nutriente o a limitantes de otros factores de crecimiento que impidieron la expresión del rendimiento.

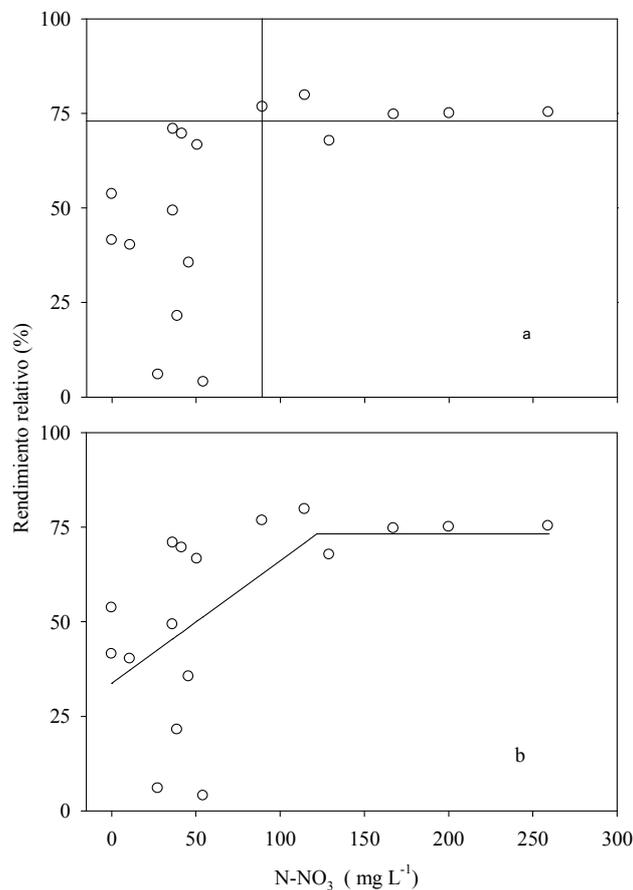


Figura 4. Relación entre el rendimiento relativo y la concentración de NO_3^- en jugo de tejido fresco en la base de tallos de plantas de raigrás muestreadas previo al primer corte. Cada círculo representa un bloque. Las líneas en la Figura 4a dividen el gráfico en cuatro cuadrantes según Cate y Nelson; en la Figura 4b representan el modelo lineal-plateau (LP) ajustado para los datos, $\text{MIN}(34 + 0,32x, 73)$, $R^2 = 0,34$.

Esta metodología de determinación de niveles críticos ha sido utilizada para encontrar indicadores de suficiencia de N y predecir la respuesta al agregado de este nutriente en cultivos anuales. Sainz Rozas et al. (2001) trabajaron con plantas de maíz midiendo NO_3^- en planta en un estadio vegetativo temprano (V6) para determinar umbrales de suficiencia de N en el cultivo. Collins y Allison (2004) al evaluar la relación entre RR en maíz y otro indicador de suficiencia de N, la concentración de NO_3^- en suelo, mediante el uso del gráfico CN o el modelo lineal-plateau (LP), obtuvieron al igual que en este trabajo, distintos NC. Los valores de R^2 reportados por estos autores fueron 0,43 para CN y 0,39 para LP. En nuestro trabajo el coeficiente R^2 fue 0,43 y 0,34 para el gráfico de CN y el modelo LP, respectivamente. Por otro lado, Binford et al. (1990) también encontraron NC distintos con esta metodología, al evaluar la relación entre rendimiento en grano de maíz y la concentración de NO_3^- en la base del tallo pero en una etapa mas avanzada del cultivo (madurez fisiológica). Estos valores fueron utilizados como base para caracterizar el grado de consumo de lujo de N del cultivo y podrían, también, ser utilizados para guiar fertilizaciones futuras.

Un valor de RR del 73% fue el que mejor dividió los datos en los cuadrantes inferior izquierdo y superior derecho que es el objetivo del gráfico CN. Es de hacer notar que pese a que el NO_3^- en JTF se relacionó con la respuesta al agregado de N, los valores por encima del NCO encontrados en este trabajo no alcanzaron un 100% de RR lo que indicó que las parcelas no fertilizadas que no aumentaron el RR con el aumento de NO_3^- en JTF, no alcanzaron el rendimiento de las que habían sido fertilizadas. Esto podría deberse a que en las parcelas fertilizadas, el N fue agregado y utilizado al comienzo del período de crecimiento de la pastura, mientras que el N del suelo de las parcelas sin tratamiento, pudo haberse mineralizado más tardíamente y esa disponibilidad tardía no habría compensado la deficiencia inicial de N.

Para definir los rangos RDV y RCR se trabajó con el gráfico CN por ser el que tuvo mayor R^2 y menor NCO. Los límites inferior y superior del RDV fueron 49 (límite de detección del test rápido en BT) y 89 mg $\text{N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ (NCO),

respectivamente. Los valores en x del RDV corresponden a concentraciones de NO_3^- en BT donde existió deficiencia de N. Si a los valores correspondientes a los NCO de las Figuras 4a y 4b se los transforma a base seca utilizando la ecuación del modelo PL, (Figura 3b), corresponderían a 1560 y 2060 mg N- NO_3^- kg^{-1} de MS para el NCO de CN y PL, respectivamente. Esto indicaría que el método de medición de NO_3^- en JTF (que fue sensible a partir de 950 mg N- NO_3^- kg^{-1} de MS) detectaría forraje con niveles de N insuficientes para un rendimiento máximo.

Estos resultados permiten afirmar que el test de determinación en JTF permitiría detectar situaciones de deficiencia de N (RDV) en forma cuantitativa y cualitativa (debajo del RDV) y, por lo tanto, sería útil para evaluar el estatus de N de estos forrajes en momentos cercanos al primer corte o pastoreo. Plantas que se encuentran en el RDV indican que habrían necesitado cantidades crecientes de N para obtener un mayor rendimiento en el primer corte y que posiblemente necesitarían más N para el crecimiento posterior (segundo corte). Plantas que se encuentran en el RCR indicarían que habría sido necesario agregar menor dosis de N y que sería necesario el agregado N en bajas dosis en el próximo corte.

Al igual que el test de NO_3^- en la base del tallo de maíz propuesto por Binford et al. (1990), la determinación de NO_3^- en plantas previo al primer pastoreo serviría para indicar necesidades futuras de fertilización nitrogenada del forraje, pero además permitiría evaluar la calidad del cultivo. Estos resultados, si bien promisorios, no aseguran que la concentración de NO_3^- en planta en el primer corte se relacione con la respuesta al N en el corte siguiente. Futuros trabajos deberían enfocarse entonces, al estudio del ajuste de la fertilización teniendo en cuenta el riesgo de toxicidad para animales asociado al contenido de NO_3^- en los forrajes.

Relación entre los niveles de nitrato en base de tallos y en el suelo al momento de la recolección de las muestras vegetales

La concentración de NO_3^- en BT aumentó con el incremento de las concentraciones de NO_3^- en el suelo tanto en JTF como en ETS hasta alcanzar un

plateau (Figura 5). En esta figura aparecen todas las observaciones realizadas para los 7 sitios. La relación encontrada al primer corte, seguramente no se obtendría en el segundo debido a que el nivel de NO_3^- en el suelo suele ser insuficiente para reconstruir el área foliar de la pastura y lograr un rendimiento de materia seca aceptable en los cortes sucesivos.

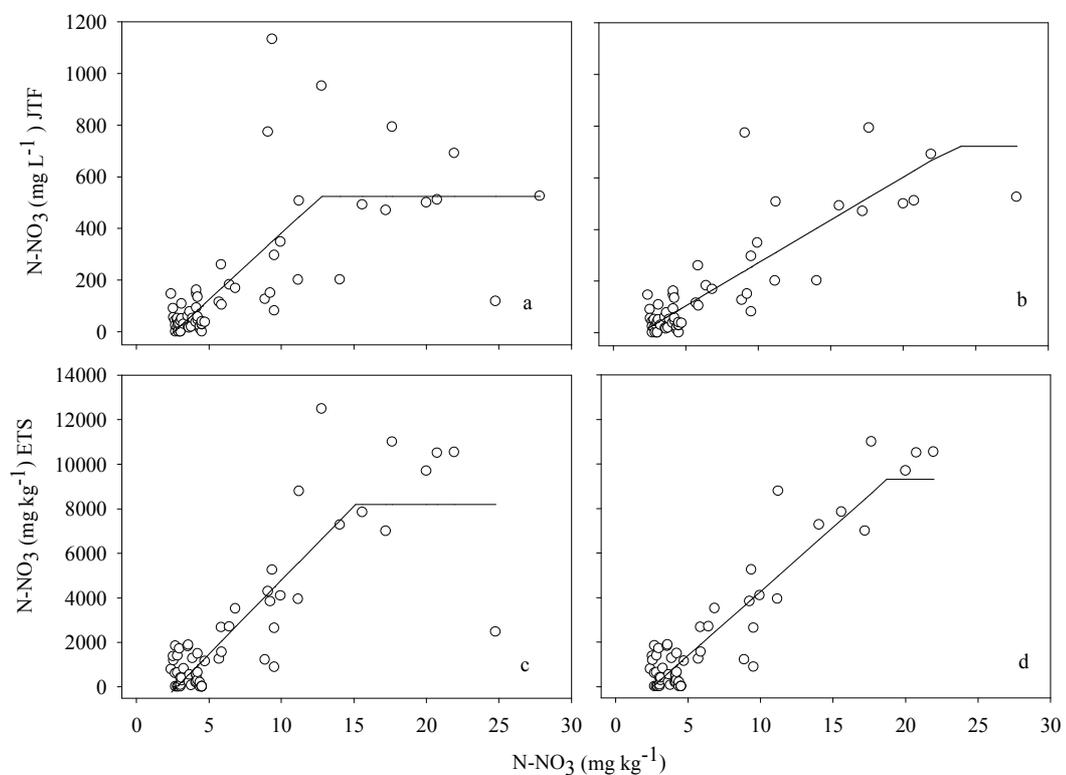


Figura5. Relación entre la concentración de NO_3^- en la base de tallos de plantas de raigrás (y) y en suelo al momento de la recolección de las muestras vegetales (x). La concentración de NO_3^- en planta se cuantificó en: a) jugo de tejido fresco (JTF) considerando todas las observaciones por sitio; b) JTF sin considerar tres puntos; c) extracto de tejido seco (ETS) considerando todas las observaciones por sitio; d) extracto de tejido seco (ETS) sin considerar los tres puntos omitidos en la Figura 5b. En los cuatros casos (a, b, c y d) la línea continua representa el modelo LP de forma, $\text{MIN}(a+bx, P)$. Los niveles críticos fueron 13 y 24 $\text{mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ para las Figuras a y b respectivamente; 15 y 19 $\text{mg N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS para las Figuras c y d, respectivamente.

De los dos modelos LP ajustados para JTF considerando todos los puntos [MIN (-134 + 52x, 524), $R^2= 0,56$] o sin considerar tres de ellos [MIN (-62 + 33x, 722), $R^2= 0,71$] surgieron niveles críticos de 13 y 24 mg N-NO₃⁻ kg⁻¹ de suelo, respectivamente (Figuras 5a y 5b). Cuando el ajuste del modelo LP se hizo entre NO₃⁻ en suelo y ETS, considerando todos los puntos [MIN (-184 + 664x, 8189), $R^2= 0,75$] o sin considerar tres de ellos [MIN (-1472 + 572x, 9314), $R^2= 0,85$] se obtuvieron niveles críticos de 15 y 19 mg N-NO₃⁻ kg⁻¹ de suelo respectivamente (Figura 5c y 5d). La mayor correlación en ETS que en JTF entre NO₃⁻ en suelo y NO₃⁻ en planta podría explicarse por una mayor precisión de la técnica de medición en ETS.

De la Figura 5 surge que las plantas concentraron NO₃ en forma proporcional a la concentración en suelo hasta un determinado valor, por encima del cual la concentración en BT se mantuvo constante, por lo que se podría suponer que existió una regulación por parte de la planta respecto a la absorción de NO₃⁻. El transporte de este ion hacia la célula está regulado por señales externas e internas a la planta y se conoce que muchos transportadores son inhibidos por productos derivados de su reducción como amonio y glutamina (Monza y Marquez, 2004). Así, el transporte de NO₃⁻ disminuye si el amonio está presente o los niveles celulares de NO₃⁻ son altos. La entrada de NO₃⁻ a la célula va acompañada de una despolarización de la membrana la que es favorecida por el incremento de la concentración de NO₃⁻ en el medio. En situaciones de exceso en el suministro de NO₃⁻, éste se puede acumular en la vacuola. La acumulación de este ion sin generar aumento de rendimiento se considera un indicador de consumo de lujo (Munson y Nelson, 1990) y se podría sugerir que existió tal consumo entre el rango de valores que va desde 122 (plateau de la Figura 4b) hasta 524 o 722 mg N-NO₃⁻ L⁻¹ (plateau de las Figuras 5a y 5b, respectivamente).

CONSIDERACIONES FINALES

Si bien este trabajo incluyó datos de un sólo año, los resultados obtenidos permiten afirmar que el test rápido es una herramienta útil para conocer en forma cuantitativa y relativamente rápida la concentración de NO_3^- en JTF de estos verdeos. El test propuesto serviría para determinar qué verdeos deberían ser pastoreados y/o qué precauciones deberían ser adoptadas en el manejo de la alimentación del rumiante, ya que el nivel de toxicidad aguda supera al límite de detección del test (LDT). Además, con el test rápido se podría determinar si las plantas se encuentran en el rango cuantitativo de deficiencia vegetal (RDV) o en el rango de consumo restringido (RCR). Cultivos con concentraciones de NO_3^- dentro del RDV y del RCR podrán ser utilizados como alimento de bovinos siempre y cuando se tomen medidas preventivas.

El manejo futuro de la fertilización nitrogenada debería tender a que las plantas se encuentren con valores de NO_3^- en este último rango porque habrían alcanzado un alto RR y además, estarían por debajo de los niveles máximos de toxicidad aguda y muerte (Figura 6).

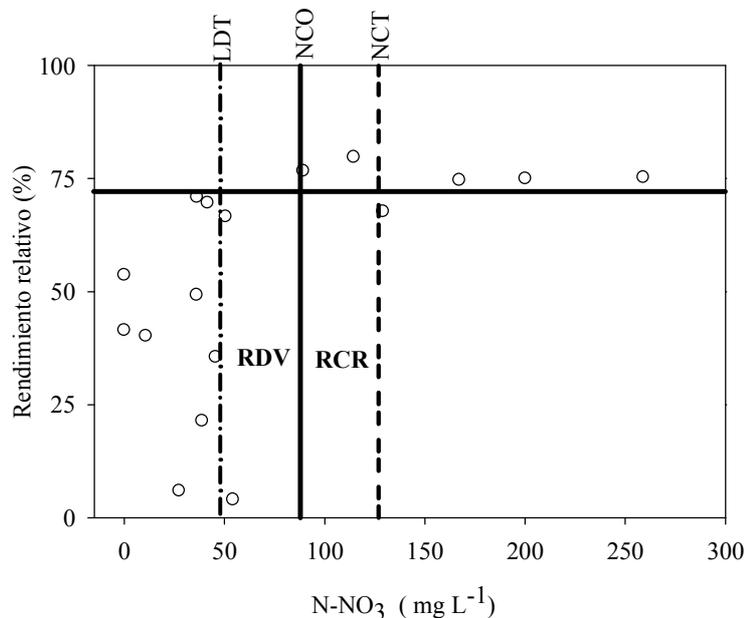


Figura 6. Relación entre el rendimiento relativo (%) y la concentración de NO_3^- en jugo de tejido fresco, en la base de tallos de plantas de raigrás, bajo tratamiento de cero N. Las líneas enteras dividen el gráfico en cuatro cuadrantes según Cate y Nelson; las líneas punteadas indican el límite de detección del test rápido (LDT) y el nivel crítico tóxico (NCT) los que delimitan el rango cuantitativo de deficiencia vegetal (RDV) y el rango de consumo restringido (RCR). La intersección de las líneas enteras, surgidas del modelo CN, determina el nivel crítico óptimo (NCO).

BIBLIOGRAFIA

- Alexander, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. México, AGT, 491 p.
- Anderson, K.A. and Case, T.E. 1999. Evaluation of plant nitrate extraction techniques and effect on commonly used analytical methods. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 30 (9 &10): 1479-1495.
- Baker, L.M. and Tucker, B.B. 1971. Effects of rates of N and P on the accumulation of NO_3^- -N in wheat, oats, rye and barley on different sampling dates. *Agron. J.* 63:204-207.
- Binford, G.D.; Blackmer, A.M. and El-Hout, N.M. 1990. Tissue Test for excess nitrogen during corn production. *Agron. J.* 82:124-129.
- Binford, G.D.; Blackmer, A.M. and Meese, B.C. 1992. Optimal concentration of nitrate in cornstalks at maturity. *Agron. J.* 84:881-88.7.
- Black, C.A. 1993. Soil fertility evaluation and control. Lewis Publisher. Boca Raton, FL, USA.
- Bray, R.H. and Kurtz, L.T. 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.* 59:39-45.
- Bremner, J.M. and Keeney, D.R. 1965. Exchangable ammonium, nitrate and nitrito by steam distillation methods. En: Black, C.A. (Ed). *Methods of soil analysis: quemical and microbiological properties*. Madison: American Society of Agronomy; Soil Science Society of America. pp. 1191-1206.
- Casanova, O. 1997. Manejo de la fertilización en verdeos; En: Universidad de la República, Facultad de Agronomía. Unidad de Educación Permanente, Cátedra de Fertilidad. *Manejo de la fertilidad en producciones extensivas (Cereales y Pasturas)*. Mercedes-Soriano. pp. 62-64.
- Casanova, O.; Carbone, A.; Cerveñansky, A. y Larrosa, A. 2007. Rendimiento y calidad de raigrás en función de la fertilización nitrogenada. En: XVII Congreso latinoamericano de la ciencia del suelo. León, Guanajuato, México. p.71.

- Cash, S.D.; Funston, R.; King, M. and Wichman, D.M. 2002. Nitrate toxicity of Montana forages. Available at: <http://www.montana.edu/wwwpb/pubs/mt200205.pdf>. Verificado 25 Nov. 2007)
- Cataldo, D.; Haroon, M.; Schrader, L. and Youngs, V. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications Soil Science Plant Analysis* 6:71-80.
- Collins, S.A. and Allison, D.W. 2004. Nitrogen management. Soil nitrate concentration used to predict nitrogen sufficiency in relation to yield in Perennial Grasslands. *Agron. J.* 96:1272-1281.
- Crawford, R.F.; Kennedy, W.K. and Johnson, W.C. 1961. Some factors that affect nitrate accumulation in forages. *Agron. J.* 53:159-162.
- Durán, A.; Califra, A.; Molfino, J. H. and Lynn, W. 2006. Keys to Soil Taxonomy for Uruguay. United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service. 77 p.
- Echeverria, HE; Rozas, H.S.; Herfurt, E. y Uhart, S.A. 2001. Nitrato en la base del tallo del maíz: I cambios durante la estación de crecimiento. *Ciencias del Suelo.* 19 (2).
- Fontes, P.C.; Coelho, E. L. and Cardoso, A. C. 2003. Petiolo Sap Nitrate and Leaf Nitrogen Critical Values in Melon Plants Grown in Unheated Greenhouse and Field Conditions. *Journal of Plant Nutrition.* 26:1403-1411.
- García, F.O. 2005. Criterios para la fertilización del cultivo de maíz. Jornada "Maíz 2005" Córdoba, Argentina.
- Gul, A. and Kolp, B.J. 1960. Accumulation of nitrate in several oat varieties at various stages of growth. *Agron. J.* 1960. 52: 504-506.
- Hoel, B.O. 1999. Determination of nitrogen status in winter wheat by measuring basal stem tissue sap nitrate concentration. *Acta Agric. Scand., Sect. B Soil and Plant Sci.* 49:82-91.

- INIA. Unidad GRAS INIA Las Brujas. 2005. (en línea). Consultado diciembre, 2005.
Disponible en: <http://www.inia.org.uy/online/site/14378211.php>
- Lyons, D.J.; Haeley , G.M. and Jeffrey, A.J. 1992. A sap test for the early diagnosis of toxic levels of nitrate in ryegrass. *Tropical Grasslands*. 26:165-170
- MacKnown, T.C. and Weik, J.C. 2004. Forage & grazing lands. Comparison of laboratory and quick-test methods for forage nitrate. *Crop Sci*. 44:218-226.
- Mantovani, J.R.; Pessoa da Cruz, M.C.; Ferreira, M.E. e Barbosa, J. C. 2005. Comparacao de nitrato em tecido vegetal. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 40:53-59.
- Maynard, D.N.; Barker, A.V.; Minotti, P.L. and Peck, N.H. 1976. Nitrate accumulation in vegetables. *Advances in Agronomy*, 28: 70-118.
- Mieres, J.M. y La Manna, A. 2008. Intoxicación por nitratos, otro problema que nos deja la seca. Consultado Nov. 2008. Disponible en: www.inia.org.uy/estaciones/la_estanzuela/actividades/documentos/nitratos.pdf.
- Molfino, J.H. y Califra, A. 2001. Agua disponible de las tierras del Uruguay (en línea) Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección General de Recursos Naturales Renovables. División Suelos y Aguas. Consultado diciembre, 2008. Disponible en http://www.mgap.gub.uy/renare/SuelosyAguas/EstudiosBasicosdeSuelos/agua_disponible.pdf
- Monza, J. y Márquez, A. 2004. El metabolismo del nitrógeno. Córdoba, Almuzara, p.176.
- Mosca, V.; Perez, W.; Sierra, L. and Gigena, S. 2006. Factors affecting Nitrate Levels in Pastures. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 5(5):443-446.
- Mulvaney, R.L. 1996. Nitrogen Inorganic forms. p. 1123-1184. En: D. L. Sparks (ed.) Part 3. SSSA Book Ser. 5. SSSA, Madison, WI. Methods of soil analysis.
- Munson, R.D. and Nelson, W. L. 1990. Principles and practices in plant analysis. P. 359-387. En: R. L. Westerman (ed.) Soil testing and plant analysis. 3rd ed. SSSA Book Series N° 3. SSSA, Madison, WI.

- O'Hara, P.J. and Fraser, A.J. 1975. Nitrate poisoning in cattle grazing crops. *New Zealand Veterinary Journal*. 23(4): 45-53
- Perdomo, C. 1997. Fertilización N en cultivos de invierno; *En*: Universidad de la República, Facultad de Agronomía. Unidad de Educación Permanente, Cátedra de Fertilidad. Manejo de la fertilidad en producciones extensivas (Cereales y Pasturas). Mercedes-Soriano. P. 68-71.
- Pigurina, G. y Banchemo, G. 1992. Estudio de casos de intoxicación por nitratos en vacas lecheras en el departamento de Colonia. INIA La Estancia. Hoja de Divulgación No 028. s.p
- Rattin, J. E.; Giletto, C. M. y Echeverria, H. E. 2004. Comparación de métodos de determinación de nitrato en pecíolos de cultivares de papa. *RIA*. 33(1):117-134.
- Riley, E. A.; Thompsom , T. L.; White, S. A. and Ottman, M. J. 1999. Developing sap nitrate tests for durum wheat and barley. [en línea]. University of Arizona. College of Agriculture. Consultado oct. 2008. Disponible en <http://ag.arizona.edu/pub/crops/az1147/>
- Ross, P.F. 1996. Veterinary analytical toxicology. 14 p. 5. *En*: P. Cunniff (ed) Official methods of analysis of AOAC International: Agricultural chemicals; Contaminants; Drugs. 16th ed. (I) AOAC International. Gaithersburg, Maryland.
- Rosen, C.J.; Errebhi, M. and Wang, W. 1996. Testing petiolo sap for nitrate and potassium: A comparison of several analytical procedures. *HortScience*. 31:1173-1176.
- Sainz Rozas, HR; Echeverria; HE; Herfurt, H. y Studdert, G.A. 2001. Nitrate en la base del tallo del maíz: II diagnóstico de la nutrición nitrogenada. *Ciencias del Suelo*. 19(2).
- SAS Institute. 1990. SAS/STAT user's guide. Version 6. 4th ed. Vol. 1. Sas Inst., Cary, NC.

- Shreve, B.R. and Miller, R.O. 2002. Methods of Analysis for Nitrate in Forages. In: NFTA, Annual Meeting Proceedings, National Forage Testing Association, Omaha, NE (in press).
- Thomas, G.W. 1982. Exchangeable cations. p. 159-165. En: A. L. Page (ed.) Methods of soil analysis. Part 2. 2nd ed. Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, WI.
- Thompson, T.T, Ottman, M.J. and Riley-Saxton, E. 2004. Basal stem nitrate test for irrigated malting barley. Agron. J. 96:516-524.
- Uruguay. INASE. 2005. resultados experimentales de evaluación de especies forrajeras para el registro nacional de cultivares anuales, bianuales y perennes. Colonia-La estanzuela. p.63
- Valdes, A.; Marti, L.; Filippini, M.F. y Salcedo, C. 2004. Determinación de nitratos en vegetales. Comparación de cuatro métodos analíticos. FCA UNCuyo. XXXVI (1): 21:28
- Vitosh, M.L. and Silva, G.H. 1994. A rapid portable soil nitrate-nitrogen test for potatoes. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 25: 183-190
- Walkley, A. and Black, T.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Sci. 37: 29-38.

IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

Las concentraciones de NO_3^- presentadas para acelga, espinaca y lechuga no sobrepasaron las concentraciones límites establecidas por la UE. Sin embargo, esto no implica que no se pueda superar el valor de la ingesta diaria admisible establecida por la OMS. Para el caso de la lechuga, ingiriendo 5 hojas de esta hortaliza con una concentración de NO_3^- alta de $11134 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS se alcanzaría el consumo máximo recomendado para una persona de 70kg que ingiere el 70% del NO_3^- a través del consumo de lechuga. Si la concentración en esta hortaliza fuera baja, $6385 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS, entonces ese límite se alcanzaría consumiendo 23 hojas de lechuga.

El test rápido de determinación de NO_3^- en planta serviría para discriminar muestras de hortalizas con concentración de NO_3^- no recomendables, con un error máximo de rechazar hortalizas con niveles adecuados de NO_3^- de 23%. Este error se puede considerar aceptable en centros de distribución de verduras donde no se realizan actualmente medidas de control, ya que la pérdida de exactitud se compensaría con los bajos costos y la rapidez de análisis, lo que permitiría replicar muestras dudosas.

A diferencia de lo encontrado en hortalizas, en el caso de los verdeos se encontraron concentraciones de NO_3^- en ETS que superaron el límite considerado como de toxicidad aguda y muerte. Los máximos valores determinados fueron superiores a 7000 y $12000 \text{ N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS en PE y BT respectivamente. Las relaciones lineales positivas, con R^2 mayor a $0,78$ y b mayor a 1 entre la concentración de NO_3^- en BT y PE de una misma muestra, medida en ETS y en JTF, confirmaron que la BT concentró más NO_3^- que la PE, como lo señala Maynard (1976). Estos resultados son especialmente importantes en condiciones de pastoreo de otoño- invierno cuando no hay otra oferta de forraje o cuando se sobrepastorea la pastura, situación donde el animal consume la base de los tallos.

Los modelos ajustados al comparar concentraciones de NO_3^- medidas en ETS y JTF fueron diferentes para las hortalizas y verdeos estudiados. Cuando se consideraron los datos de las tres hortalizas, la relación entre la concentración de NO_3^- determinada

en JTF y en ETS fue lineal y positiva, variando linealmente en todo el rango de concentraciones medidas. En el caso de avena y raigrás el modelo ajustado a la relación entre concentración de NO_3^- en JTF y ETS para PE y BT fue un plateau-lineal. En el rango lineal la variación de la concentración de NO_3^- en el JTF fue explicada, en más de un 90%, por la variación en ETS. Los valores 50 y 49 $\text{mg N- NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ correspondientes a 1302 y 950 $\text{mg N- NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS para PE y BT, respectivamente, marcaron el comienzo de la linealidad en estos modelos. Este resultado implica que el test rápido comenzó a detectar incrementos en la concentración de NO_3^- en tejido seco a partir de 1302 $\text{mg N- NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS en PE. Alimentos con concentraciones de NO_3^- superiores a 1000 son considerados potencialmente tóxicos en rumiantes, incrementando el grado de toxicidad al sobrepasar las 2000 $\text{mg N- NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS (Backer et al. 1971, Lyons et al. 1992 y Shreve y Miller 2002). Por lo tanto, una vez conocida la concentración de NO_3^- en los verdeos, si ésta se encuentra dentro de niveles de riesgo se deberían tomar precauciones como la restricción en el suministro de éstos al animal o incluir otros ingredientes en la dieta que permitan el consumo de forraje sin producir daño así como el manejo del horario en que se permite el consumo de verdeos.

A pesar de que el método rápido fue sensible a partir de concentraciones altas, tendría gran utilidad para el productor ya que el rango superior de concentraciones que detectó es el más crítico en cuanto al efecto económico inmediato, pues abarca valores considerados de toxicidad aguda y muerte en los animales.

Los niveles críticos surgidos de aplicar el modelo CN y LP, a la relación entre RR y la concentración de NO_3^- en JTF de BT separaron claramente dos zonas que describen el estatus de N en el cultivo al momento del primer corte: una zona de deficiencia de N con requerimientos crecientes y una zona de deficiencia menor, ya que no se alcanzó el 100% de RR en aquellas muestras que superaron el NC de NO_3^- en planta. Esto hace que en el caso de verdeos, el test desarrollado además de tener aplicación en el manejo del pastoreo, determine el estatus de N en el cultivo al

momento del primer corte. Esto último sería de utilidad para evaluar las decisiones de fertilización tomadas y poder modificarlas o no a futuro.

En este trabajo no se evaluó el NO_3^- en planta como predictor de la respuesta a la fertilización nitrogenada. Para poder remediar deficiencias de N durante el ciclo del cultivo habría que conocer la relación entre la concentración de NO_3^- en JTF en una etapa temprana del cultivo, diferente a la etapa de evaluación del rendimiento. Futuros trabajos en este tema deberían, además, incluir más número de evaluaciones y más años de estudio para disminuir el efecto de sitio, de variedad, y de posible estado sanitario que puedan enmascarar los resultados.

V. RESUMEN

Las consideraciones que llevaron al planteo de los dos trabajos presentados fueron: la escasa información nacional de valores de concentración de NO_3^- en plantas, el desconocimiento del riesgo de intoxicación por NO_3^- , la escasa investigación de indicadores de suficiencia de N como el NO_3^- en verdes invernales y la falta de implementación de métodos rápidos de determinación de NO_3^- en jugo de vegetales.

Las especies utilizadas en el primer trabajo presentado fueron acelga (*Beta vulgaris*), espinaca (*Spinacia oleracea*) y lechuga (*Lactuca sativa* var. *Capitata*). Las concentraciones de NO_3^- en el tejido vegetal se determinaron por colorimetría por nitración del ácido salicílico en jugo de tejido fresco (C-TF), (test rápido) y por potenciometría con electrodo de actividad específica en tejido seco (P-TS), (método de referencia). Las medidas obtenidas se compararon mediante análisis de regresión lineal y covarianza. Debido a que los coeficientes a y b de los modelos lineales ajustados para cada hortaliza no difirieron ($P < 0,05$) se ajustó un modelo lineal con los datos de las tres hortalizas. Este arrojó un $R^2 = 0,69$. Existió un error constante e independiente a cada determinación por C-TF de $85,45 \text{ mg L}^{-1} \text{ N- NO}_3^-$. Adicionalmente, se evaluó el error del método C-TF al identificar como no aceptables

o aceptables muestras que el método de referencia identificaría como aceptables o no aceptables, respectivamente, en función del consumo de NO_3^- recomendado por la OMS. La metodología utilizada hace una discriminación cualitativa a partir de concentraciones críticas calculadas. El error de aceptar muestras no recomendables osciló entre 0 y 19% y el de rechazar muestras aceptables entre 0 y 23%.

En el segundo trabajo presentado se utilizaron cultivos de raigrás (*Lolium multiflorum*) y avena (*Avena sativa*) por ser ampliamente utilizados en Uruguay en ganadería intensiva y lechería. Las concentraciones de NO_3^- en el tejido vegetal se determinaron por colorimetría por nitración del ácido salicílico en jugo de tejido fresco (C-TF), (test rápido) y en extracto de tejido seco (ETS). La relación entre NO_3^- en JTF y en ETS para BT y PE fue descrita por un modelo plateau- lineal (PL) ($R^2 > 0,90$). Los valores máximos determinados fueron 7365 y 12470 mg N- $\text{NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ de MS en PE y BT, respectivamente. Estos valores son considerados como potencialmente tóxicos para rumiantes. Al relacionar el rendimiento relativo (RR) con la concentración de NO_3^- en JTF de BT de las parcelas testigo, se determinó un nivel crítico (89 mg N- $\text{NO}_3^- \text{ L}^{-1}$) que separó una zona de mayor deficiencia de otra con menor deficiencia de N. Se definieron rangos de concentración (cuantitativo de deficiencia vegetal, RDV y de consumo restringido, RCR), donde el test rápido detectaría variaciones de NO_3^- . El test rápido permitiría detectar cultivos aptos para ser consumidos en forma restringida, ya que el límite de detección estuvo por debajo del nivel crítico óptimo (NCO) y tóxico (NCT).

VI. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments). 2007. Estimation du niveau d'exposition aux nitrates et aux nitrites de la population française. Réponse à la demande d'appui scientifique et technique de la DGCCRF réf. 2007-SA-0070 du 8/01/2007.

- Baker, L.M. and Tucker, B.B. 1971. Effects of rates of N and P on the accumulation of NO₃-N in wheat, oats, rye and barley on different sampling dates. *Agron. J.* 63:204-207
- Bartholomew, B. and Hill, M. J. 1984. The pharmacology of dietary nitrate and the origin of urinary nitrate. *Food Chem.Toxicol.* 22: 789-795.
- Bedwell, C. L.; Hamar, D. W; Hoesterey, M.L.; Sonderman, L.P. and Odde, K.G. 1995. Comparison of four methods for forage nitrate analysis. *J Vet Diagn Invest* 7:527-530.
- Black., C. A. 1993. Soil fertility evaluation and control. Lewis Publisher. Boca Raton, FL, USA.
- Blom-Zandstra. 1989. Nitrate accumulation in vegetables and its relationship to quality. *Ann. appl. Biol.* 115:553-561.
- Ellen, G.; Schuller, P.L.; Bruijns, E.; Froeling, P.G. and Baadenhuijsen, H.U. 1982. Volatile nitrosamines, nitrate and nitrite in urine and saliva of healthy volunteers after administration of large amounts of nitrate. *IARC Sci.Publ.* 365-378.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2008. Nitrate in vegetables. EFSA scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *EFSA Journal.* 689: 1-79. Consultado mayo 2009. Disponible en http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/contam_ej_689_nitrate_en.pdf.
- Fontes, P.C.; Coelho, E. L. and Cardoso, A. C. 2003. Petiolo Sap Nitrate and Leaf Nitrogen Critical Values in Melon Plants Grown in Unheated Greenhouse and Field Conditions. *Journal of Plant Nutrition.* 26:1403-1411.
- Havlin, J.L.; Beaton, J.D.; Tisdale, S.L. and Nelson, W.L. 2005. Soil fertility and fertilizers, an introduction to nutrient management. 7th Edition. 515 p. Pearson/Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ.

- Hoel, B.O. 1999. Determination of nitrogen status in winter wheat by measuring basal stem tissue sap nitrate concentration. *Acta Agric. Scand., Sect. B Soil and Plant Sci.* 49:82-91.
- Kanaan, S.S. and Economakis, C.D. 1992. Effect of climatic conditions and time of harvest on growth and tissue nitrate content of lettuce in nutrient film culture. *Acta Hort. (ISHS)* 323:75-80.
- Lyons, D.J.; Haeley, G.M. and Jeffrey, A.J. 1992. A sap test for the early diagnosis of toxic levels of nitrate in ryegrass. *Tropical Grasslands.* 26:165-170
- Marquez, A.J., Betti, M., García-Calderon, M., Palove-Balang, P., Díaz, P. and Monza, J. 2005. Nitrate assimilation in *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany.* 56(417): 1741-1749.
- O'Hara, P.J. and Fraser, A.J. 1975. Nitrate poisoning in cattle grazing crops. *New Zealand Veterinary Journal.* 23(4): 45-53
- Ross, P.F. 1996. Veterinary analytical toxicology. 14 p. 5. En: P. Cunniff (ed) *Official methods of analysis of AOAC International: Agricultural chemicals; Contaminants; Drugs.* 16th ed. (I) AOAC International. Gaithersburg, Maryland.
- Shreve, B. 2002. Management of nitrate and prussic acid in forage crops En: *Proceedings, Western Alfalfa and Forage Conference, 11-13 December, 2002, Sparks, NV, UC.* Consultado febrero, 2009. Disponible en <http://alfalfa.ucdavis.edu/+symposium/proceedings/2002/02-117.pdf>.
- Shreve, B.R. and Miller, R.O. 2002. Methods of Analysis for Nitrate in Forages. In: *NFTA, Annual Meeting Proceedings, National Forage Testing Association, Omaha, NE.*
- Self, J.R. and Waskom, R.M. 2008. Nitrates in Drinking Water. Consultado abril, 2009. Disponible en <http://www.ext.colostate.edu/PUBS/crops/00517.html>.
- Spiegelhalter, B.; Eisenbrand, G. and Preussmann, R. 1976. Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in vivo formation of N-nitroso compounds. *Food Cosmet.Toxicol.* 14: 545-548.

- Stephany, R.W. and Schuller, P.L. 1980. Daily dietary intakes of nitrate, nitrite and volatile nitrosamines in the Netherlands using the duplicate portion sampling technique. *Oncology* 37:203-210.
- Thompson, T. T.; Ottman, M.J. and Riley-Saxton, E. 2004. Basal stem nitrate test for irrigated malting barley. *Agron. J.* 96:516-524.
- Turek, B.; Hlavsova, D.; Tucek, J.; Waldman, J. and Cerna, J. 1980. The fate of nitrates and nitrites in the organism. *IARC Sci.Publ.* 625-632.
- Van Eysinga, R. 1984. Nitrate and glasshouse vegetables. *Fertilizer Research* 5:149-156.
- Weightman, R.M.; Dyer, C.; Buxton, J. and Farrington, D.S. 2006. Effects of light level, time of harvest and position within field on the variability of tissue nitrate concentration in commercial crops of lettuce (*Lactuca sativa*) and endive (*Cichorium endiva*). *Food Addit.Contam* 23, 462-469.
- Wright, M.J. and Davison, I.U. 1964. Nitrate accumulation in crops and nitrate poisoning in animals. *Adv. Agron.* 16:197-247.