

AVANCES

EN CIENCIAS E INGENIERÍAS

Editor

Cesar Zambrano, Ph.D.
Decano del Colegio de Ciencias

Co-Editor

Diego F. Cisneros-Heredia, Ph.D.(c)
Coordinador de Comunicación y Difusión Científica

Consejo Editorial

Santiago Gangotena, Ph.D.
Canciller

Carlos Montúfar, Ph.D.
Vice Canciller, Decano Académico

Ximena Córdova, Ph.D.
Decana del Colegio de Ingenierías

Stella de la Torre, Ph.D.
Decana del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Ing. Fernando Romo, M.Sc.
Coordinador Ingeniería Civil

María de Lourdes Torres, Ph.D.
Vice Decana del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Producción y Distribución

F. Javier Torres, Ph.D.
Editor de Producción

Julio Ibarra, M.Sc.
Coordinador de Distribución

Editores Asociados - USFQ

Carlos Montúfar, Ph.D.
Stella de la Torre, Ph.D.
Ximena Córdova, Ph.D.
F. Javier Torres, Ph.D.
Fausto Pasmay, M.Sc.
Carlos Marín, Ph.D.
Alexis Hidrobo, Dr.
Carlos Fabara, M.Sc.

Fernando Romo, M.Sc.
María de Lourdes Torres, Ph.D.
René Játiva, M.Sc.
Edison Bonifaz, Ph.D.
Julio Ibarra, M.Sc.
Darío Niebieskikwiat, Dr.
Carlos Valle, Ph.D.
Sonia Zapata, M.Sc.

Editores Asociados - Externos

Eric E. Dueno, Ph.D. Bainbridge College
John G. Blake, Ph.D. University of Florida
Bette A. Loisel, Ph.D. University of Florida
Theofilos Toulkeridis, Ph.D. Escuela Politécnica del Ejército
Cesar Costa, Ph.D. Escuela Politécnica Nacional
Marcelo Albuja, M.Sc. Escuela Politécnica Nacional
Robert Cazar, M.Sc. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo
Carlos Ventura, Ph.D., P.E., P.Eng. The University of British Columbia

Diseño e Impresión

G&R, Universidad San Francisco de Quito

Web Master

Jaime Páez

Avances en Ciencias e Ingenierías es una publicación científica y multidisciplinaria que publica trabajos originales producidos por investigadores de cualquier institución o país que deseen reportar resultados de alta calidad y relevancia en todas las áreas de las ciencias y las ingenierías, incluyendo trabajos en la interfase de varias disciplinas. *Avances en Ciencias e Ingenierías* tiene como propósito divulgar trabajos de investigación de importancia dirigidos a la comunidad científica local e internacional.

Guía para autores

Todos los manuscritos deben cumplir los lineamientos mínimos de esta guía, caso contrario serán devueltos a los autores para su corrección. Se recibirán manuscritos en formatos de Microsoft Word, OpenOffice Writer y LaTeX. No se aceptarán manuscritos enviados en formato PDF. Para manuscritos en LaTeX se debe seguir el archivo de estilo usfq.cls disponible en la página web de la revista <http://www.usfq.edu.ec/publicaciones/revistas/avances/>. Los manuscritos con más de 2000 palabras serán considerados como *Artículos* y deben tener: (a) Título, nombres de los autores, afiliación institucional y direcciones postales; (b) Resumen y Abstract; (c) Introducción; (d) Metodología; (e) Resultados y Discusión; (f) Agradecimientos; (g) Referencias bibliográficas; (h) Leyendas de figuras y tablas. Los manuscritos con menos de 2000 palabras serán considerados *Comunicaciones Breves* y deben tener: (a) Título, nombres de los autores, afiliación institucional y direcciones postales; (b) Resumen y Abstract; (c) Texto –sin divisiones adicionales– (d) Agradecimientos; (e) Referencias bibliográficas; (f) Leyendas de figuras y tablas. Las figuras no deben incluirse en el archivo del manuscrito. El texto y las tablas van en un mismo archivo, mientras que las figuras serán enviadas en archivos separados. Si las figuras o tablas han sido previamente usadas, es responsabilidad del autor el obtener el permiso necesario.

Formato del Manuscrito

- El manuscrito deberá ser escrito usando un tipo de letra *Times New Roman* con un tamaño de letra de 11 puntos y a espacio seguido. Los márgenes deben ser de 30 mm a la izquierda y 15 mm a la derecha.
- El título debe ser conciso y directo, indicando los elementos claves. Debe ser escrito con un tamaño de letra de 12 puntos, en negrillas, centrado y sólo la primera palabra debe ser mayúscula.
- La afiliación completa de cada investigador debe ir asociada con su nombre por medio de superíndices y colocarse separada por una línea debajo de los nombres con un tamaño de letra de 10 puntos. El autor para correspondencia debe ir claramente identificado por un asterisco y se debe incluir su correo electrónico.
- Todo artículo deberá incluir como mínimo un resumen detallado en español y un abstract detallado en inglés. Cada uno será redactado en un párrafo continuo y no debe superar las 300 palabras.
- La introducción debe ser concisa y detallada, revisando literatura relevante y actual, y presentando antecedentes del estudio, datos sobre su importancia, justificación y objetivos.
- La primera vez que una especie de ser vivo sea mencionada, debe siempre ir primero su nombre científico (en cursiva), luego del cual se puede mencionar el nombre común (con formato de nombre propio).
- Las referencias en el texto deben ir numeradas secuencialmente y se colocarán al final de la oración correspondiente dentro de un corchete, ejemplos: [10], [10,15,22], [12-20]
- Las abreviaciones deberán usarse lo menos posible y no deberán permitir ambigüedad alguna. El significado de todas las abreviaciones deberá ser indicado la primera vez que se use la abreviación.
- Las tablas y figuras deberán estar citadas con números arábigos en el orden que aparezcan en el texto; ejemplos: Tabla 1; Tablas 1-3; Figura 1; Figuras 1,4; Figuras 1-3
- Cada tabla o figura debe tener su propia leyenda explicativa, la cual debe ser corta y comprensible sin hacer referencia al texto y será colocada debajo de la tabla o figura respectiva.
- La lista de referencias debe titularse: Referencias Bibliográficas; y debe ordenarse de acuerdo al orden de aparición en el texto del manuscrito y su formato seguirá los ejemplos detallados en: <http://www.usfq.edu.ec/publicaciones/revistas/avances/>

Instrucciones para Figuras

Las figuras deben ser enviadas en alta resolución. Las fotografías en blanco y negro, fotografías a color y mapas y gráficos realizados en programas basados en raster (e.g. Photoshop, Gimp) deben ser enviadas en formato *.tiff de 1000 pixeles.

Envío del Manuscrito

Los manuscritos deben ser enviados al Editor, Cesar Zambrano, vía correo electrónico a la dirección: avances@usfq.edu.ec. Al enviar el manuscrito, los autores deben confirmar en su mensaje de envío que el manuscrito no ha sido publicado o sometido para publicación en otro sitio y que todos los autores han participado en el desarrollo del manuscrito, lo han leído y están de acuerdo con su envío.

Revisión del Manuscrito

Los manuscritos serán manejados por el Co-Editor y los Editores Asociados, quienes enviarán el manuscrito para evaluación por parte de revisores externos reconocidos (nacionales e internacionales) en cada área. Los autores del artículo pueden sugerir tres revisores apropiados (no ligados directamente al desarrollo del estudio reportado). Los principales criterios para la aceptación son originalidad, rigor científico, contexto, relevancia y seguimiento del estilo y formato requerido para la revista. Nuestro objetivo es indicar a los autores la decisión tomada en un tiempo máximo de ocho semanas luego del envío.

Pruebas de Imprenta y Publicación del Manuscrito

Las pruebas de imprenta serán enviadas al autor para correspondencia como un archivo PDF. Las pruebas revisadas y corregidas deben ser enviadas al Editor dentro de 15 días hábiles luego de su recepción. El autor para correspondencia recibirá vía correo electrónico un archivo PDF en alta definición de su artículo y 1 revista impresa para cada co-autor, entregada vía correo postal.

Avances en Ciencias e Ingenierías –ISSN 1390-5384–

Publicación semestral (Junio y Diciembre) de la Universidad San Francisco de Quito

Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador.

Telf. Ed. +593 2 297 1700 Ext. 1451 FAX +593 2 289 0070.

Email Comité Editorial: avances@usfq.edu.ec

<http://www.usfq.edu.ec/publicaciones/revistas/avances/>

SECCIÓN A: CIENCIAS EXACTAS

- A1–A13** ■ **Estudio Teórico Cuanto Mecánico de Cristales Formados por Nanoclusters de Nitruro de Boro [B_iN_i, i = 12]**
V. Posligua, C. Zambrano, F. J. Torres
Avances, 2013, Vol. 5, No. 1, Pags. A1-A13
-
- A14–A21** ■ **Influence of the wind direction variability on the quantification of tephra fallouts: December 2012 and March 2013 Tungurahua eruptions**
B. Bernard, J. Bustillos, B. Wade, S. Hidalgo
Avances, 2013, Vol. 5, No. 1, Pags. A14-A21

SECCIÓN B: CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

- B1** ■ **Erratum: Presencia de *Brucella* sp. en cabras de la ciudad de Quito, provincia de Pichincha, Ecuador. Publicado en Avances, 2012, Vol. 4, No. 2, Pags. B9-B11**
C. Zabala, V. Barragán, G. Trueba
Avances, 2013, Vol. 5, No. 1, Pag. B1
-
- B2-B4** ■ **First report of Porcine Circovirus 2 (PCV2) circulation in Ecuador**
E. Bermeo, V. Barragán, A. Torres, A. Acosta, G. Trueba
Avances, 2013, Vol. 5, No. 1, Pags. B2-B4
-
- B5-B9** ■ **Detección de *Coxiella burnetii* en leche de bovinos domésticos del Ecuador**
M. Isabel Rojas, V. Barragán, G. Trueba, H. Hornstra, T. Pearson, P. Keim
Avances, 2013, Vol. 5, No. 1, Pags. B5-B9
-
- B10-B13** ■ **Difficulties in the differential diagnosis of dengue and leptospirosis in Guayaquil**
A. Abril Gamboa, L. Vasco, M. Espinel, J. Coloma, G. Trueba
Avances, 2013, Vol. 5, No. 1, Pags. B10-B13
-
- B14-B21** ■ **Influence of vegetation types and ground cover on soil water infiltration capacity in a high-altitude páramo ecosystem**
E. Suárez R., E. Arcos, C. Moreno, A. C. Encalada, M. Álvarez
Avances, 2013, Vol. 5, No. 1, Pags. B14-B21
-
- B22-B33** ■ **Genetic Diversity and Conservation of the Misty Grouper (*Hyporthodus mystacinus*) in the Galapagos Islands, Ecuador**
A. M. Avila, C. A. Valle, A. M. Troya
Avances, 2013, Vol. 5, No. 1, Pags. B22-B33
-
- B34-B39** ■ **Construcción de bacmids recombinantes con genes inmunogénicos del virus de la fiebre aftosa usando el sistema Bac-to-Bac**
P. Andrade, D. Palacios
Avances, 2013, Vol. 5, No. 1, Pags. B34-B39
-
- B40-B48** ■ **Estandarización de un protocolo para detección de OGMs: evaluación de la presencia de OGMs en granos de soya colectados en diferentes centros de acopio de Ecuador**
M. de Lourdes Torres, L. Mejía, V. Arahana
Avances, 2013, Vol. 5, No. 1, Pags. B40-B48
-
- B49-B57** ■ **Genetic diversity of an entomopathogenic fungi collection from Ecuador using a modified AFLP approach**
V. Arahana, N. Bastidas, M. de Lourdes Torres, P. González
Avances, 2013, Vol. 5, No. 1, Pags. B49-B57
-
- B58-B63** ■ **Diversidad de hormigas en parches de bosques secos y húmedos de Costa Rica**
C. M. Márquez-Baltán, L. D. Márquez-Rea, J. A. Márquez-Rea
Avances, 2013, Vol. 5, No. 1, Pags. B58-B63
-
- B64-B75** ■ **Evaluación y manejo de fuentes semilleras de Teca (*Tectona grandis* Linn. f.) en la Estación Experimental Tropical Pichilinue, Ecuador**
A. Cañadas, D. Rade, C. Zambrano, C. Molina, L. Arce
Avances, 2013, Vol. 5, No. 1, Pags. B64-B75

SECCIÓN C: INGENIERÍAS

- C1–C8 ■** **Mobility extraction in ultra thin, body buried oxide and fully depleted silicon-on-insulator MOSFET**
L. Miguel Prócel, J. Moreno, F. Crupi, L. Trojman
Avances, 2013, Vol. 5, No. 1, Pags. C1-C8
-
- C9–C13 ■** **Evaluación de diferentes niveles de povidexrosa y azúcar en la elaboración de una jalea de guanábana (*Annona muricata L.*)**
M. José Rosero, S. Santacruz, Y. Álvarez, M. Caviedes
Avances, 2013, Vol. 5, No. 1, Pags. C9-C13
-
- C14–C21 ■** **Diseño y simulación de antena inteligente asistida por GPS para un vehículo aéreo no tripulado**
F. Cuesta, R. P. Játiva E.
Avances, 2013, Vol. 5, No. 1, Pags. C14-C21
-
- C22–C30 ■** **Determinación de los parámetros hidrodispersivos de una falda acuífera mediante pruebas con trazadores**
C. Fallico, M. F. Rivera, A. C. Ríos, A. Molinari, P. Santillán, M. Salazar
Avances, 2013, Vol. 5, No. 1, Pags. C22-C30
-
- C31–C38 ■** **Effect of the substrate as electron donor during the microbial sulfate reduction and its possible applications in the biological treatment of acid mine drainage**
V. Andrade, V. Ochoa-Herrera
Avances, 2013, Vol. 5, No. 1, Pags. C31-C38
-
- C39–C42 ■** **Factor de emisión de CO₂ debido a la generación de electricidad en el Ecuador durante el periodo 2001 - 2011**
R. Parra
Avances, 2013, Vol. 5, No. 1, Pags. C39-C42
-

Estudio Teórico Cuanto Mecánico de Cristales Formados por Nanoclusters de Nitruro de Boro [B_iN_i , $i = 12$]

V. Posligua^{1,2*}, C. Zambrano^{1,2} y F. J. Torres^{1,2}

¹Grupo de Química Computacional y Teórica (QCT-USFQ), Universidad San Francisco de Quito.
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador, Casilla Postal: 17-1200-841

²Grupo Ecuatoriano para el Estudio Experimental y Teórico de Nanosistemas –GETNano–
Universidad San Francisco de Quito, Edificio Newton, Oficina N102C

*Autor principal/Corresponding author, e-mail: victorhph@gmail.com

Editado por/Edited by: Eric Dueno, Ph.D.

Recibido/Received: 08/04/2013. Aceptado/Accepted: 06/05/2013.

Publicado en línea/Published on Web: 28/06/2013. Impreso/Printed: 06/06/2013.

Abstract

Although it has been predicted that boron nitride clusters (i.e., B_iN_i , $i = 12-24$) are capable of forming stable periodic structures, little is known about the electronic and vibrational properties of these solids. In this work, a quantum mechanical study of the $B_{12}N_{12}$ system using periodic models is presented to theoretically characterize this material and determine its potential applications such as the ability to absorb guest molecules such as molecular hydrogen. All the calculations were performed with the program CRYSTAL09 using the B3LYP (HF-DFT hybrid functional) and a localized Gaussian-type basis set of different flexibility. Electrostatic potential maps of different planes of the $B_{12}N_{12}$ system showed that the crystalline structure has sites capable of hosting molecular species due to their low electron density. Moreover, the computed vibrational frequencies allowed the identification of well-defined zones of the IR-spectrum of this solid.

Keywords. $B_{12}N_{12}$, H_2 storage, boron nitride clusters, periodic structures

Resumen

Aunque se ha sugerido que los clusters de nitruro de boro (i.e., B_iN_i , $i = 12-24$) son capaces de agregarse y formar estructuras periódicas estables, se conoce poco sobre las propiedades electrónicas y vibracionales de estos sólidos. En este trabajo, un estudio cuanto mecánico del sistema $B_{12}N_{12}$ es presentado utilizando modelos periódicos para caracterizar teóricamente este material y determinar sus posibles aplicaciones tales como la capacidad para adsorber moléculas huéspedes, en particular hidrógeno molecular. Todos los cálculos se realizaron mediante el programa CRYSTAL09 usando el funcional híbrido B3LYP (HF-DFT) y funciones base localizadas de tipo Gaussiano de diferente flexibilidad. Mapas de potencial electrostático de diferentes planos del sistema $B_{12}N_{12}$ mostraron que la estructura cristalina tiene sitios capaces de alojar especies moleculares debido a su baja densidad electrónica. Las frecuencias vibracionales calculadas permitieron la identificación de zonas bien definidas del espectro IR de este sólido. Además se realizó un estudio de almacenamiento de moléculas huésped en las superficies del cristal en planos seleccionados.

Palabras Clave. $B_{12}N_{12}$, almacenamiento de H_2 , clusters de nitruro de boro, estructuras periódicas

Introducción

Aunque actualmente existe un debate mundial con respecto a los factores que causan el denominado *calentamiento global* [1], existen varios estudios [2–5] en los que se ha concluido que el uso de combustibles fósiles para la producción de energía es la razón principal para que se de este fenómeno climático al que nos enfrentamos en la actualidad. Desde el punto de vista ambiental este hecho es sumamente preocupante especialmente

porque la demanda energética mundial se encuentra suplida casi en su totalidad justamente por el uso de petróleo, carbón y gas natural [6]. Adicional al aspecto ambiental, se debe considerar que la dependencia extrema que la humanidad tiene en los combustibles fósiles es perjudicial también desde el punto de vista económico ya que se ha determinado recientemente [7] que las reservas de carbón, petróleo y gas natural, que son los principales combustibles fósiles, se encuentran actualmente en fase de agotamiento. Considerando esto, se advierte un fu-

turo catastrófico para la humanidad si no se encuentran prontamente fuentes de energía alternativas capaces de reemplazar eficientemente el uso de los combustibles fósiles.

Una de las soluciones más prometedoras que se han planteado en los últimos años es el uso de hidrógeno molecular (H_2) [1] como vector energético. La generación de energía mediante la combustión de H_2 no es solo un procedimiento eficiente y seguro, sino que es limpio si se considera que el sub-producto de la combustión de este compuesto es únicamente agua [8].

La economía del hidrógeno es un modelo energético que tiene por objetivo el sostener las actividades humanas mediante el empleo del H_2 como vector energético [1, 9]. Este modelo contempla tres pasos fundamentales para su aplicación: (i) Producción, (ii) Almacenamiento y (iii) Uso. Actualmente se han encontrado los medios tecnológicos para producir y usar el hidrógeno molecular de forma eficiente [7], pero lamentablemente no se han encontrado métodos adecuados para su almacenamiento, razón por la cual no se ha podido iniciar con la transición desde la economía basada en el uso de combustibles fósiles hasta aquella que se basa en el empleo de H_2 .

Para entender el reto tecnológico que representa el almacenamiento de H_2 se debe considerar que este compuesto en estado natural es un gas poco compresible [10] y que posee una baja densidad energética, lo que significa que se necesitan grandes volúmenes de hidrógeno para producir una cantidad significativa de energía. A este respecto, el departamento de energía de Estados Unidos ha establecido que un sistema de almacenamiento de H_2 para aplicaciones móviles debería alcanzar un valor de 5.5wt % hasta el año 2015 y un 7.5wt % hasta el año 2020 para reemplazar por completo el requerimiento de combustibles fósiles en aplicaciones móviles [11, 12]. Dichos valores han sido obtenidos considerando que un vehículo con una pila combustible en base a hidrógeno molecular necesitaría más de 3kg de combustible para alcanzar una autonomía de unos 500 km [11].

En la actualidad existen varias propuestas de métodos [1, 13, 14] que buscan solucionar el problema del almacenamiento del H_2 . Los métodos más comunes que se usan actualmente son la compresión en tanques de alta presión y el uso de contenedores criogénicos. Ninguno de estos métodos se ha podido aplicar a gran escala ya que su implementación supone condiciones extremas de operación (i.e., temperaturas bajas y presiones altas); por lo que actualmente se están explorando otras formas de almacenamiento, en particular aquellas que se basan en la adsorción física y química del hidrógeno.

La ventaja que la fisisorción (i.e., adsorción) posee sobre las otras formas de almacenamiento es que las fuerzas que atan las moléculas del H_2 al material adsorbente son producto de fluctuaciones resonantes de la distribución de cargas conocidas como fuerzas de dispersión (i.e.,

interacciones de Van der Waals), en las que las energías involucradas son del orden de 3 a 6 kJ/mol estimados a $T=135$ K y $P = 1$ atm. El proceso de adsorción se lleva a cabo cuando se tienen temperaturas criogénicas [15]. Sin embargo se debe considerar que el factor determinante para esto es el tipo de material que se considere para el almacenamiento y como éste interactúa con el H_2 . A este respecto, se han propuesto varios materiales como medios para el almacenamiento de hidrógeno molecular, como por ejemplo nanotubos de carbono, zeolitas, MOF's (Metal – Organic Frameworks), PIM's (polímeros con microporosidad intrínseca), entre otros [15].

Una de las aplicaciones más importantes de la nanotecnología es el diseño a nivel atómico y molecular de nuevos materiales. Por lo tanto se puede aseverar que la nanotecnología tiene un rol fundamental en la búsqueda de materiales capaces de almacenar hidrógeno molecular en concentraciones apropiadas para lograr aplicaciones móviles eficientes [16]. La nanotecnología ha tenido un gran impacto en el campo de la química siendo un tópico de actual interés el estudio de nanoclusters de átomos [16–18], los cuales poseen importancia tanto en catálisis como en el desarrollo de nuevos materiales de varias aplicaciones. Dentro del campo de los nanoclusters, los compuestos B_iN_i ($i=2-24$) han sido estudiados a profundidad de forma teórica usando modelos moleculares. El motivo por el cual se emplean estos modelos es que en la literatura existe poca cantidad de estudios con modelos periódicos, y es por esto que el presente estudio tiene como objetivo el de caracterizar este compuesto y de esta manera poder determinar sus potenciales aplicaciones como por ejemplo, la capacidad para adsorber moléculas huéspedes, en este caso particular hidrógeno molecular.

Métodos

Descripción del sistema $B_{12}N_{12}$

El modelo periódico del $B_{12}N_{12}$ empleado en el presente estudio teórico fue generado a partir de los datos reportados por Matxian et al. [19] para este sistema. Los vectores base de la celda unitaria empleados fueron: $a = 8.4319\text{Å}$, $b = 8.4319\text{Å}$ y $c = 8.4319\text{Å}$.

El sistema cristalino $B_{12}N_{12}$ se encuentra compuesto por pares de boro y nitrógeno (i.e., un par B – N es isoeléctrico a los pares C – C) los mismos que forman esferas compuestas por 6 cuadrados y 8 hexágonos. La celda unitaria de este cristal está formada por un total de 48 átomos: 24 átomos de boro y 24 átomos de nitrógeno. Una característica importante de este sistema es que siempre se encontrarán átomos de boro y nitrógeno alternados, por lo que nunca se podrán encontrar enlaces B – B o N – N. Espacialmente los 48 átomos de la celda unitaria forman dos esferas, cada una con 24 átomos de boro y nitrógeno, que se encuentran unidas a través de un cubo como se observa en la Figura 1. Al

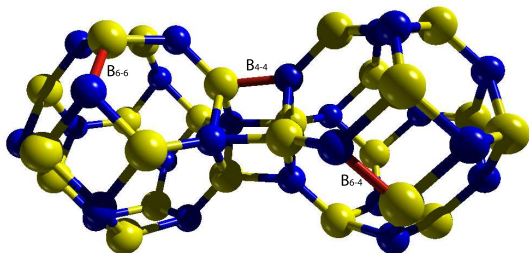


Figura 1: Estructura del dímero $B_{12}N_{12}$ obtenida por Matxain, et al. [19]

expandirse la celda unitaria en las tres dimensiones, las dos esferas de 24 átomos dan lugar a la formación de estructuras de mayor dimensión en las que se pueden encontrar cuadrados, hexágonos y octágonos que limitan una cavidad microporosa como se observa en la Figura 2. Las longitudes de enlace B – N fueron determinadas teóricamente por Matxain, et. al. [19] y Oku, et. al. [20]. En la Tabla 1 se encuentran resumidos datos teóricos acerca de este sistema, los mismos que ayudarán a validar el modelo empleado en el presente estudio como se explicará en las siguientes secciones. En el $B_{12}N_{12}$ existen tres tipos de enlace: el primero se encuentra en la unión de dos hexágonos (BN_{6-6}), el segundo se encuentra en la unión de un hexágono y un cuadrado (BN_{6-4}) y por último el tercero une dos cuadrados (BN_{4-4}).

Construcción del sistema $B_{12}N_{12}$

Como se expuso anteriormente, el modelo periódico de $B_{12}N_{12}$ se construyó en base del modelo molecular reportado en Matxain et. al. [19]. En este modelo se presentaba únicamente las coordenadas cartesianas de la celda unitaria optimizada y los vectores de red del dímero, los mismos que se muestran en la Ecuación 1.

$$\begin{bmatrix} a \\ b \\ c \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 5,934 & 5,934 & 0 \\ 5,934 & 0 & 5,934 \\ 0 & 5,934 & 5,934 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x \\ y \\ z \end{bmatrix} \quad (1)$$

Para poder transformar a coordenadas fraccionarias, las cuales son necesarias para la construcción de sistemas cristalinos, se utilizó la matriz inversa de los vectores de la red del dímero, como se muestra en la Ecuación 2.

$$\begin{bmatrix} x \\ y \\ z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0,08413 & 0,08413 & -0,08413 \\ 0,08413 & -0,08413 & 0,08413 \\ -0,08413 & 0,08413 & 0,08413 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a \\ b \\ c \end{bmatrix} \quad (2)$$

Una vez obtenido el modelo periódico, se empleó el programa CRYSTAL09 para realizar los cálculos de simulación cuanto mecánica. En una primera fase de los cálculos, el modelo periódico del $B_{12}N_{12}$ fue optimizado

	Matxain et. al. [19] (B3LYP)	Oku, et. al. [20] (PM5)
Anillos tetragonales	6	6
Anillos hexagonales	8	8
BN_{6-4} (Å)	1.486	1.527
BN_{6-6} (Å)	1.441	1.462
BN_{4-4} dímero (Å)	1.577	-
Band gap (eV)	5.2	5.1

Tabla 1: Datos teóricos del sistema $B_{12}N_{12}$

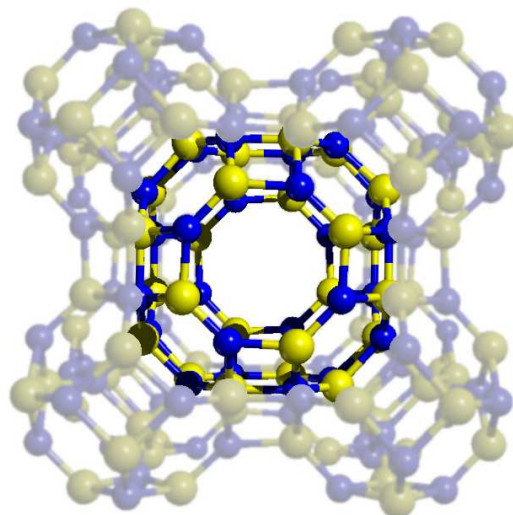


Figura 2: Estructura del $B_{24}N_{24}$ rodeado por 8 monómeros $B_{12}N_{12}$

sin emplear restricciones de simetría, es decir asumiendo que el cristal resultante pertenece al grupo espacial P1 [19]. El objetivo de asumir este grupo espacial fue porque se consideró importante que, si bien los cristales $B_{12}N_{12}$ tienen alta simetría, el sistema requiere de más grados de libertad para poder determinar su estabilidad desde el punto de vista teórico considerando que no existen reportes experimentales que indiquen la síntesis de este sistema.

CRYSTAL09 determina las posiciones de equilibrio atómico usando un algoritmo modificado del gradiente conjugado similar al de Schlegel [21] para casos moleculares. La convergencia para la optimización de la geometría del modelo es probada mediante la raíz cuadrática media (RMS) y el valor absoluto del componente mayor de los gradientes y desplazamientos nucleares. El desplazamiento y el gradiente son calculados mediante los elementos de la matriz de densidad entre las iteraciones del i -ésimo y del $i-1$ -ésimo átomo. Se establecen umbrales para los valores máximos y RMS de los gradientes y desplazamientos: 0.000450, 0.000300, 0.001800, 0.001200, respectivamente (valores en a.u.). Una vez alcanzados estos valores simultáneamente, el proceso de optimización se considera completo [22]. Para todos los cálculos se utilizó el Hamiltoniano B3LYP, el cual es un híbrido Hartree – Fock/DFT y varios conjuntos de funciones base, como se resume en la Tabla 2. Este Hamiltoniano es comúnmente usado en química cuántica molecular y cálculos de estado sólido y proporciona excelentes resultados en cuanto a propiedades estructurales y electrónicas [23–26].

Átomo	Conjunto de funciones base A (BSA)	Conjunto de funciones base B (BSB)
Boro	B_6-21G* [27]	B_6-21G* [27]
Nitrógeno	N_6-21G* [28]	N_6-21G* [28]
Hidrógeno	H_3-1p1G* [29]	H_5-11G* [30]

Tabla 2: Resumen de conjunto de funciones base utilizados en el análisis del sistema $B_{12}N_{12}$

Simulación de fuerzas débiles

La energía de amarre es un ejemplo de fuerzas débiles y, como se indica adelante, representan un reto para los métodos de simulación cuanto mecánica que se emplean en el presente estudio. La energía de amarre se define mediante un enfoque supramolecular el mismo que consiste en comparar la energía de un complejo con las energías de los fragmentos que lo constituyen, como se observa en la Ecuación 3:

$$BE = E_A + E_B - E_{AB} \quad (3)$$

Donde E_{AB} es la energía del complejo, E_A y E_B son las energías de los fragmentos independientes. La precisión en la estimación de la energía de amarre depende de la eficiencia de los métodos cuanto mecánicos en la descripción de las fuerzas intermoleculares, las mismas que tienen relevancia en la estabilización del complejo. Es importante mencionar que las aproximaciones basadas en métodos DFT brindan resultados sobresalientes desde un punto de vista estructural, sin embargo estos métodos fallan en simulaciones de fuerzas débiles como por ejemplo las fuerzas de Van der Waals, las mismas que son indispensables en estudios teóricos enfocados en la adsorción [23, 31]. Estas fuerzas en especial se las conoce como fuerzas de dispersión, las mismas que son generadas a partir de la interacción de la distribución de carga y puede ser descrita a través de métodos de correlación basados en la expansión de la función de onda y que incluyan la dinámica electrónica [32, 33].

Error por la superposición del Basis Set (BSSE)

Se conoce que los estudios teóricos de interacciones entre adsorbente y adsorbato con conjuntos base finitos centrados en posiciones atómicas (como en el presente estudio) dan lugar a errores de superposición del conjunto base. Este error aparece cuando el conjunto base de cada fragmento del sistema interactúa, provocando el solapamiento de las funciones base del adsorbente y del adsorbato. Como resultado de este error se obtienen siempre energías de amarre sobre - estimadas, las cuales deber ser corregidas. Para poder tratar el BSSE, se usa la corrección de contraposición (counterpoise) de Boys y Bernardi [34]. Esta corrección permite obtener energías de amarre exentas de los errores BSSE. Esta energía de amarre BE^{CP} del complejo AB compuesta por los fragmentos interactuantes A y B se expresa como se muestra en las Ecuaciones 5 y 6.

$$BE^{CP}(AB) = [E_{AB}^{AB}(AB) - E_A^A(A) - E_B^B(B)] + [E_{AB}^A(A) + E_{AB}^B(B) - E_{AB}^{AB}(A) - E_{AB}^{AB}(B)] \quad (4)$$

$$BE^{CP}(AB) = \Delta E(AB) + \delta_{AB}^{BSSE} \quad (5)$$

Donde $E_Y^Z(X)$ es la energía de X con una geometría Y con un basis set Z y δ_{AB}^{BSSE} es el término de corrección de contraposición, el cual depende de los parámetros estructurales del complejo.

Frecuencias anarmónicas

El estiramiento anarmónico del enlace H-H fue calculado considerando al enlace entre los hidrógenos como un oscilador independiente. La energía potencial total fue calculada a siete puntos diferentes ($\Delta_{H-H} = -0.2, -0.16, -0.06, 0.00, 0.16, 0.24$ y 0.30), y una curva polinomial de sexto grado usada para ajustar los puntos de energía. Las primeras transiciones vibracionales ω_{01} y ω_{02} fueron obtenidas resolviendo numéricamente la ecuación de Schrödinger en una sola dimensión, después la constante anarmónica ($\omega_e x_e$) y el estiramiento armónico de H - H (ω_e) fueron calculados usando las ecuaciones 7 y 8.

$$\omega_e x_e = \frac{2\omega_{01} - \omega_{02}}{2} \quad (6)$$

$$\omega_e = \omega_{01} + \omega_e x_e \quad (7)$$

Corrección de energías de amarre P-ONIOM

Las aproximaciones P-ONIOM han sido propuestas como un esquema general que permite la corrección de las energías de amarre debidas a fuerzas débiles que han sido obtenidas en modelos periódicos mediante métodos DFT. Estas aproximaciones consisten en la división de un sistema periódico en dos partes (descritas a diferentes niveles de teoría): (i) el sistema real y (ii) el sistema modelo. El sistema real es la estructura periódica completa, en cambio el sistema modelo contiene un conjunto de átomos en el cual se encuentra la porción de interés para el análisis de las fuerzas de dispersión. Al momento de crear un sistema modelo se deben añadir átomos de hidrógeno que saturan el modelo en el caso en el que se deban cortar enlaces covalentes. Una consideración adicional es que el sistema modelo es un conjunto de átomos extraído de una estructura periódica en la que los efectos de los dipolos eléctricos no existen, se debe tener cuidado al momento de crear o diseñar dichos conjuntos sin tener irregularidades que den lugar a momentos dipolares artificiales, los cuales afectarán en el cálculo de las energías de amarre causando sobrestimaciones en los resultados [35]. De acuerdo a lo anteriormente explicado se puede decir que la energía de amarre P-ONIOM se obtiene como se muestra en la Ecuación 4:

$$BE_{ONIOM} = BE_{\text{Nivel bajo, Sist real}} + BE_{\text{Nivel alto, Sist modelo}} - BE_{\text{Nivel bajo, Sist modelo}} \quad (8)$$

Donde $BE_{\text{Nivel bajo, Sist real}}$, $BE_{\text{Nivel alto, Sist modelo}}$ y $BE_{\text{Nivel bajo, Sist modelo}}$ son energías de amarre para el sistema real analizado con un nivel de teoría bajo y las dos siguientes para el sistema modelo con un nivel de teoría alto y un nivel de teoría bajo, respectivamente. Cabe recalcar que al momento de hablar de niveles de teoría altos esto no necesariamente significa que se use un método más preciso para los cálculos (i.e., CI o MP2),

sino que el nivel de teoría usado puede ser mejorado aumentando la flexibilidad de sus funciones base. Sin embargo se debe aclarar que un nivel de teoría alto puede considerarse como un mejoramiento del basis set combinado con el uso de un método de cálculo más preciso.

P-ONIOM en el sistema $B_{12}N_{12}$

Se recortó un modelo del sistema, el cual contiene al H_2 y una pequeña porción esférica de radio r del sistema cristalino, lo cual es la fracción relevante para describir la adsorción. Los cálculos a niveles de teoría mayor sobre el sistema modelo fueron realizados con el programa *Gaussian09*.

El radio máximo r considerado para recortar el sistema modelo (modelo molecular) a partir del sistema real (modelo cristalino) no sobrepasa los 5.5 Å ya que a esta distancia se considera que el hidrógeno molecular puede interactuar tanto con los átomos de boro y nitrógeno del sistema. Esta distancia se estableció considerando los radios de van der Waals tanto del hidrógeno como del boro y nitrógeno, teniendo para el hidrógeno molecular 2.9 Å, para el boro 1.92 Å y para el nitrógeno 1.55 Å. Con estas distancias se determinó que el radio en que el hidrógeno molecular puede interactuar con el $B_{12}N_{12}$ es máximo 5.5 Å.

En el presente estudio, se usó el funcional B3LYP y los conjuntos base BSA y BSB como nivel de teoría bajo, mientras que se usaron los niveles de teoría B3LYP/aug-cc-pVDZ, B3LYP/aug-cc-pVTZ, MP2/BSA, MP2/BSB, MP2/aug-cc-pVDZ y MP2/aug-cc-pVTZ como niveles de teoría altos. El motivo por el cual se utilizaron estas diferentes combinaciones de métodos y conjuntos base fue para poder realizar un análisis comparativo de las energías de amarre resultantes y así poder observar el efecto que se obtiene al aumentar el tamaño de la base o al incluir las fuerzas de dispersión con el método MP2 sobre la energía de amarre para el complejo $B_{12}N_{12} + H_2$.

Modelos

Modelo para superficie [100]

El modelo del plano [100] consta de 18 átomos en total (4 átomos de nitrógeno, 3 átomos de boro, 2 átomos de hidrógeno pertenecientes al H_2 y 9 átomos de hidrógeno como átomos ficticios). Para la elaboración de este modelo se extrajo una porción esférica del cristal con un radio $r = 4.7$ Å. El modelo obtenido se muestra en la Figura 3.

Modelo para superficie [110]

En el modelo del plano [110] se tiene 18 átomos, los cuales son 4 átomos de nitrógeno, 4 átomos de boro, 2 átomos de hidrógeno pertenecientes al H_2 y 8 átomos de hidrógeno como átomos ficticios. Para obtener esta cantidad de átomos se extrajo una porción esférica del cristal con un radio $r = 5.2$ Å. El modelo obtenido se muestra en la Figura 4.

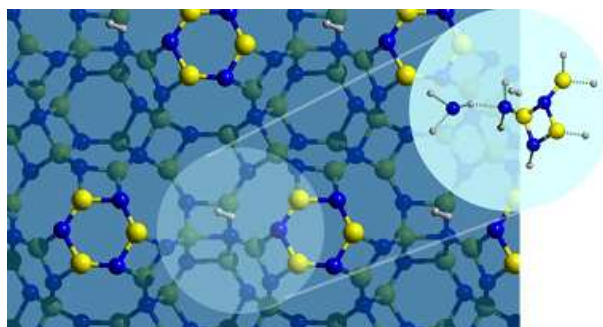


Figura 3: Modelo extraído de la superficie [100]

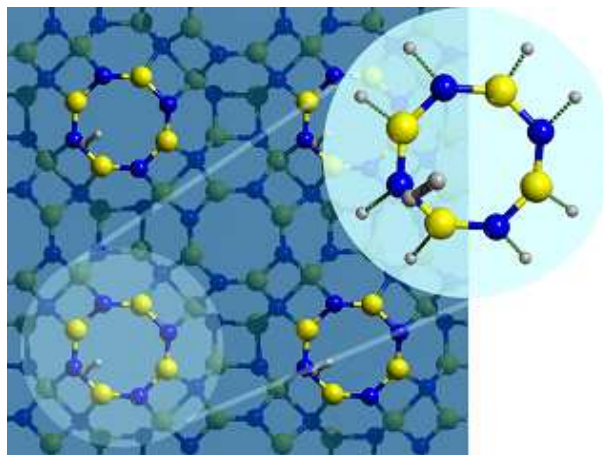


Figura 4: Modelo extraído de la superficie [110]

Modelo para superficie [112]

Como en los anteriores modelos, para la elaboración de este modelo del plano [112] se extrajo una porción esférica del cristal con un radio $r = 4$ Å obteniendo un modelo que consta de 12 átomos en total (1 átomo de nitrógeno, 3 átomos de boro, 2 átomos de hidrógeno pertenecientes al H_2 y 6 átomos de hidrógeno como átomos ficticios). El modelo obtenido se muestra en la Figura 5.

Resultados y discusiones

Propiedades estructurales

Una vez obtenida la estructura optimizada, a través del programa de visualización Moldraw, se procedió a medir

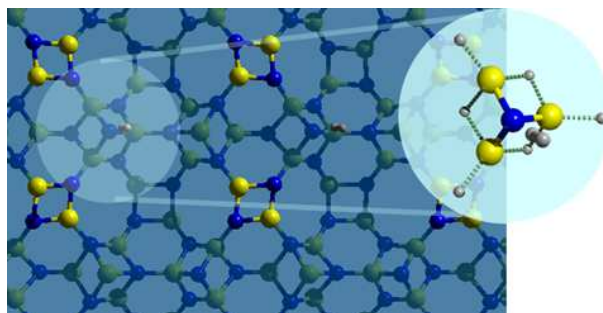


Figura 5: Modelo extraído de la superficie [112]

Tipos de enlace	Distancia medida (Å)	Error relativo comparado con [19]	Error relativo comparado con [20]
B ₆₋₄	1.6289 ± 0.000699	9.616 %	6.671 %
B ₆₋₆	1.4800 ± 0.000209	2.707 %	1.231 %
B ₄₋₄	1.5809 ± 0.000353	0.250 %	-

Tabla 3: Distancias promedio para tipos de enlaces de la estructura cristalina optimizada

las distancias B – N de los distintos tipos de enlace presentes en el sistema, señaladas en la Figura 1.

Las distancias promedio medidas para B₆₋₆, B₄₋₄ y B₆₋₄ en la estructura optimizada se muestran en la Tabla 3. Como muestra la Tabla 3, al comparar las distancias medidas de la optimización realizada con CRYSTAL09 con los datos reportados en [19] y [20], se puede apreciar que existe un error relativo considerable. La causa de esta diferencia se debe a que en los modelos moleculares reportados se considera la optimización únicamente al dímero, mientras que los cálculos de optimización realizados en este estudio se considera al sistema cristalino completo. Se espera también que exista cierto efecto debido a la reducción de la simetría considerando que en el caso de los modelos moleculares con los que se está realizando la comparación existen restricciones en los movimientos atómicos debidos a la alta simetría impuesta.

Propiedades vibracionales

Se conoce que la red cristalina de un sistema nunca es rígida puesto que los átomos pueden moverse alrededor de sus posiciones de equilibrio dentro de la estructura del material, incluso a una temperatura de 0 K (i.e., fenómeno asociado a lo que se denomina zero-point-energy). Al analizar la dinámica de la red cristalina se puede obtener una idea clara de los principales fenómenos físicos que están relacionados a los efectos termodinámicos, transiciones de fase, propiedades de transporte e interacción de la materia con radiación IR (i.e., espectro vibracional) [36].

El cálculo vibracional de frecuencias se realizó con el programa CRYSTAL09. El método empleado consiste en calcular numéricamente las derivadas de segundo orden de la energía con respecto al desplazamiento atómico, usando gradientes analíticos. Posteriormente, los autovalores son obtenidos mediante la diagonalización de la matrix Hessiana ponderada por la masa en coordenadas cartesianas, los mismos que después son convertidos en frecuencias (cm⁻¹) y en vectores propios, es decir, los modos normales [36].

Después de realizar este cálculo, se analizó la matrix Hessiana, la cual indicó que las estructuras optimizadas corresponden en realidad a un mínimo global [37, 38]. Además con los resultados del cálculo de frecuencias, se pudo obtener el espectro vibracional de dicho compuesto el cual se encuentra detallado en la Figura 6, en donde se muestra cómo se comporta el sistema a distintas frecuencias. De acuerdo a la Figura 6, se pudo encontrar que en el sistema B₁₂N₁₂ existen seis zonas bien definidas en el espectro vibracional que describen el

comportamiento a diferentes frecuencias. En la zona A, en el rango de [1424cm⁻¹ – 1075cm⁻¹], se observa que existe un estiramiento de los enlaces BN₆₋₆, en la zona B, [1075cm⁻¹ – 920cm⁻¹], hay un estiramiento de los enlaces BN₄₋₄, en cambio para la zona C, [920cm⁻¹ – 760cm⁻¹], existe torsión en los enlaces BN₆₋₆ y para la zona D, [760cm⁻¹ – 630cm⁻¹], hay un estiramiento de los enlaces BN₆₋₄. Además se encontró que en la zona E, [630cm⁻¹ – 428cm⁻¹], existe torsión en los enlaces BN₆₋₄ y en la zona F, [428cm⁻¹ – 257cm⁻¹], se presentan torsiones en los enlaces BN₄₋₄. Las zonas E y F son de particular interés para este estudio ya que contienen modos de baja energía que al ser excitados permiten la distorsión del cristal y el consecuente incremento de tamaño tanto en los túneles como las cavidades del sistema. Este incremento de tamaño en la estructura del B₁₂N₁₂ resulta interesante ya que esto permitiría que el hidrógeno molecular pueda difundirse de forma adecuada en el material.

Propiedades electrónicas – Análisis poblacional

De acuerdo a los resultados de población electrónica del sistema B₁₂N₁₂, se observó que existe una transferencia de carga en los átomos de boro y nitrógeno. Este hecho indica que pese a que las interacciones dominantes en el material son primordialmente covalentes los átomos de boro ceden un electrón al átomo más electronegativo adyacente, es decir al nitrógeno, teniendo como resultado que el número de electrones en la capa de valencia del boro será de 4 mientras que en la capa de valencia del nitrógeno hay 8 electrones.

Según estas observaciones en el análisis poblacional, se decidió realizar un cambio en los conjuntos base de ambos tipos de átomos (i.e., boro y nitrógeno). Este cambio consiste en que se ubicó uno de los electrones de la capa de valencia del boro en la capa de valencia del nitrógeno, lo que resultó en un ahorro en el tiempo de cálculo ya que al realizar este cambio manualmente, CRYSTAL09 invierte menos tiempo en llegar a convergencia en el proceso de cálculos de campo autoconsistente. Una vez realizado dicho cálculo, las cargas del B y N son muy cercanas a -1 y +1, respectivamente.

Superficies

Como se mencionó anteriormente, en este estudio también se analiza el comportamiento del sistema B₁₂N₁₂ en un arreglo superficial. Un plano cristalográfico puede ser representado a través de los índices de Miller [hkl]. Cada uno de estos índices denota un plano ortogonal a la dirección del vector (h,k,l) en la base de los vectores de la red recíproca [39].

En este sistema se puede observar (Figura 2) que, de acuerdo a su geometría, únicamente se observan caras cuadradas, hexagonales y octagonales. Al momento que se realizaron varios cortes en el sistema cristalino se obtiene que para exponer las caras cuadradas en la superficie se requiere realizar un corte en el plano [112], para exponer las caras hexagonales el corte es [100] y

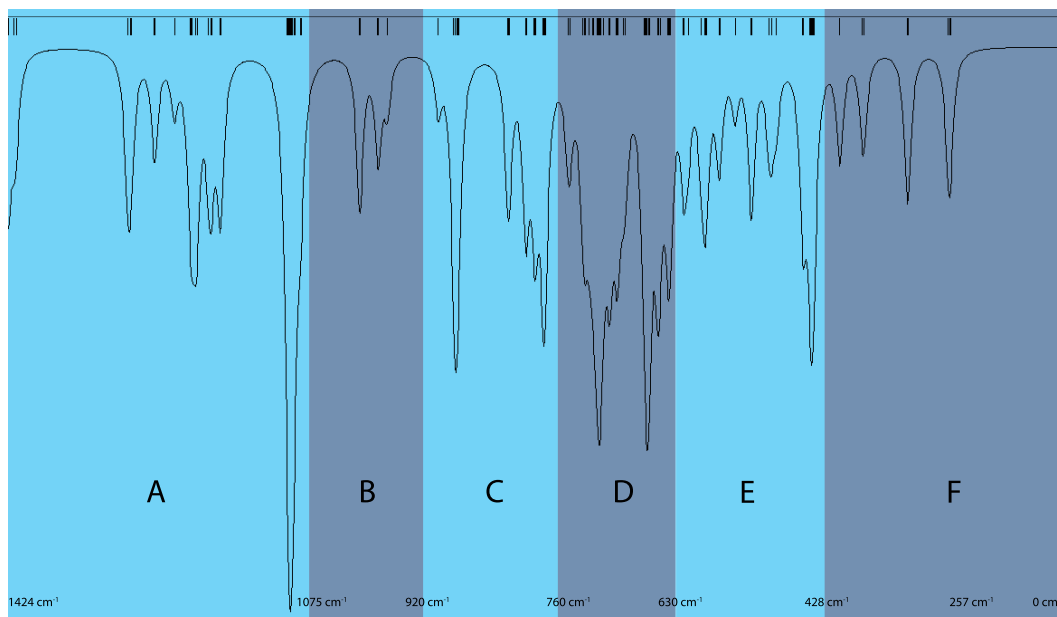


Figura 6: Espectro vibracional del compuesto $B_{12}N_{12}$ dividido en seis zonas: Zona A – Estiramiento BN_{6-6} ; Zona B – Estiramiento BN_{4-4} ; Zona C – Torsión BN_{6-6} ; Zona D – Estiramiento BN_{6-4} ; Zona E – Torsión BN_{6-4} ; Zona F – Torsión BN_{4-4}

finalmente para exponer las caras octagonales el corte es [110].

Después que se identificaron dichos cortes, se procedió a la construcción de las superficies de tal manera que cada una contenga 96 átomos (48 átomos de nitrógeno y 48 átomos de boro) con el objetivo de poder comparar sus energías y determinar la estabilidad relativa. Las energías obtenidas después del proceso de optimización en cada una de las superficies se encuentran detalladas en la Tabla 4. De acuerdo a los datos obtenidos se puede observar que el corte con menor energía es el [100], es decir el que posee caras hexagonales en su superficie.

Densidad electrónica

La densidad de carga electrónica del estado base es una observable de mucha importancia. Se conoce que el Hamiltoniano DFT reproduce características esenciales de la densidad como por ejemplo la concentración de carga a lo largo de los enlaces covalentes, la distribución uniforme de los electrones conductores en los metales, la expansión o contracción del núcleo [40].

La densidad representa la probabilidad de encontrar un electrón en varias regiones del espacio [40]. Para sistemas cristalinos, comúnmente se la representa mediante mapas de contorno de varios planos dibujado a través del sistema. Los mapas de densidad electrónica total proveen una representación gráfica de la distribución

Planos	Energías de optimización (u.a.)	ΔE (kJ/mol)
Hexagonal [100]	-3820.686	0
Octagonal [110]	-3820.559	334.3
Cuadrado [112]	-3820.023	1739.2

Tabla 4: Energías de optimización correspondientes a los diferentes cortes y estabilidad relativa (ΔE)

electrónica total. Se realizaron este tipo de mapas para cada uno de los planos seleccionados, los cuales se encuentran detallados en las Figuras 7, 8 y 9. Como se puede observar en la Figura 7, en el mapa de densidad electrónica propio del plano [100] se visualizan los hexágonos superficiales, los cuales presentan una alta población electrónica en su interior, sin embargo en secciones aledañas se observan ciertas cavidades, las cuales son la mitad de una esfera de $B_{24}N_{24}$. De igual manera, en la Figura 7 se pueden diferenciar dos tipos de arreglos formados entre tres hexágonos vecinos. En el primer arreglo se tiene la presencia de una esfera completa de $B_{24}N_{24}$, mientras que en el segundo arreglo se tiene la mitad de una esfera $B_{24}N_{24}$. En cuanto al mapa de densidad electrónica del plano [110] (Figura 8), se pueden observar las caras octagonales en su superficie las cuales presentan una población electrónica menor que en los hexágonos de la Figura 4. Además también existen cavidades con mayor densidad electrónica, las mismas que, en contraste con el anterior caso, son la mitad de una esfera de $B_{12}N_{12}$. El plano [112] (Figura 9) se escogió para analizar el caso en el cual los cuadrados se encuentran en la superficie, sin embargo además de los átomos propios de los cuadrados, en este mismo nivel se encontraron otros átomos que corresponden a un plano que corta a las esferas de $B_{12}N_{12}$. Como se puede ver en la Figura 9, a los lados de este arreglo se pueden observar cavidades que son esferas incompletas del sistema $B_{24}N_{24}$.

Interacción con H_2 molecular

Este tipo de nanoestructuras compuestas por boro y nitrógeno son análogas a las que se encuentran compuestas por carbono, pero además ofrecen ventajas adicionales. En particular se esperaría que la naturaleza heteropolar en las láminas de B – N ofrezcan una alta en-

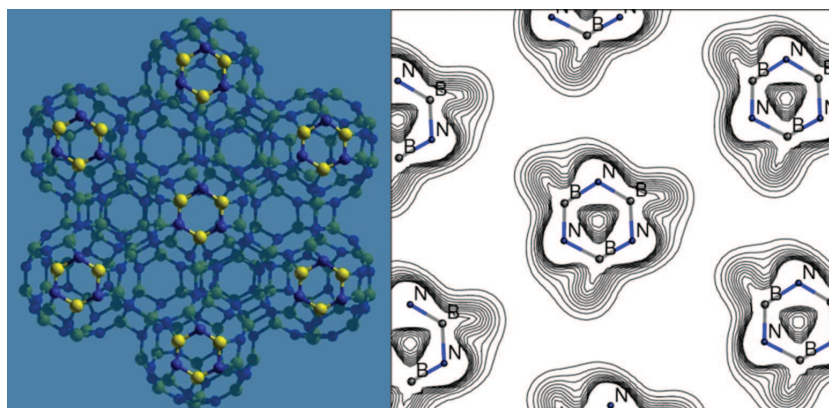


Figura 7: Plano [100] con caras hexagonales en la superficie con su correspondiente mapa de densidad electrónica

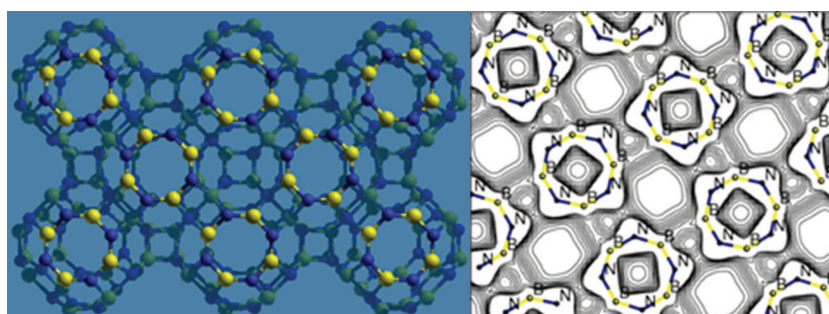


Figura 8: Plano [110] con caras octogonales en la superficie con su correspondiente mapa de densidad electrónica

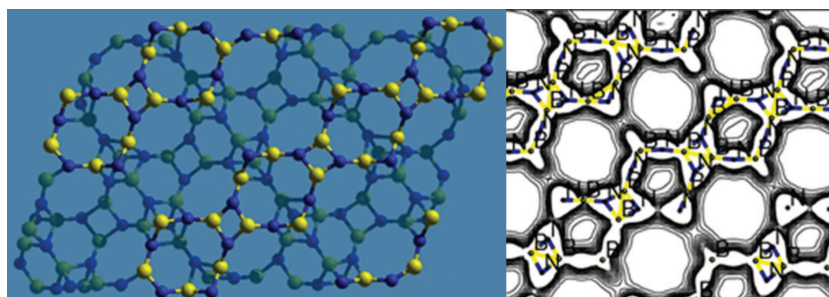


Figura 9: Plano [112] con caras cuadradas en la superficie con su correspondiente mapa de densidad electrónica

ergía de amarre para el hidrógeno comparada con los materiales basados en carbono [41, 42]. Se ha encontrado que experimentalmente los nanotubos de boro y nitrógeno, a presiones de 10MPa y temperatura ambiente, son capaces de almacenar alrededor de 1.8 - 2.6 wt % de hidrógeno y que estos nanotubos colapsados presentan una capacidad de almacenamiento hasta 4.2wt %.

Los cálculos recientes [43, 44] se han enfocado básicamente en moléculas de $B_{24}N_{24}$ y $B_{36}N_{36}$ y su capacidad de almacenamiento de hidrógeno, sin embargo no se han reportado estudios en cristales como en el presente estudio en el cual se considera el sistema cristalino $B_{12}N_{12}$, cuyas propiedades son diferentes al momento de compararlas con las moléculas antes mencionadas.

Para el estudio de la interacción del hidrógeno molecular con el $B_{12}N_{12}$ se agrega en el interior del material y sobre sus superficies una molécula de H_2 y se determina su posición de equilibrio mediante un proceso de optimización. En la geometría resultante se obtiene la

energía de amarre asociada a la molécula de hidrógeno para determinar la situación en la que se favorece la adsorción. El hidrógeno molecular incluido en el sistema $B_{12}N_{12}$ fue descrito con dos conjuntos de funciones base, los cuales se diferencian por el número de Gaussianas utilizadas para encontrar la función de onda. Es importante mencionar que se utilizaron dos conjuntos de funciones base diferentes únicamente para describir el hidrógeno molecular, mientras que a los conjuntos base tanto del nitrógeno como para boro se mantuvieron fijos (Tabla 2). La diferencia entre las bases radica en que el conjunto base A (BSA) se tiene una concentración electrónica alta cercana al núcleo ya que posee un coeficiente en la Gaussiana muy alto (187) con respecto al conjunto base B. Por ello el conjunto base B (BSB) se puede considerar difusa lo cual permite una mejor descripción de las fuerzas de dispersión.

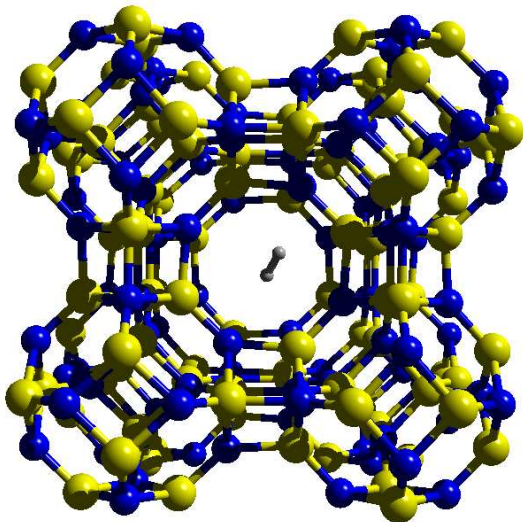


Figura 10: Sistema $B_{12}N_{12}$ cristalino incluyendo hidrógeno molecular

Adsorción de H_2 en el Sistema Cristalino $B_{12}N_{12}$

Como se mencionó anteriormente en la estructura del $B_{12}N_{12}$ optimizado, se añadió una molécula de hidrógeno para investigar su interacción con el material. En este nuevo sistema se optimizó únicamente la posición de la molécula huésped, manteniendo fijos átomos del adsorbente. Para este proceso de optimización se emplearon los dos tipos de funciones base (BSA y BSB) y se inició el proceso de optimización ubicando a la molécula de H_2 en una misma posición inicial cerca de una de las caras hexagonales del material. Como resultado, en ambos procesos de optimización se pudo observar que la posición de equilibrio del hidrógeno molecular se encuentra en la parte central de la cavidad del sistema $B_{24}N_{24}$, como se puede observar en la Figura 10.

La energía de amarre al realizar los cálculos con el conjunto base BSA es de -11.41 kJ/mol y cuando se realiza el mismo cálculo con el conjunto base BSB se encontró una energía de amarre de -0.03 kJ/mol. Es decir en ambos casos se obtuvo una interacción repulsiva entre el material y la molécula huésped.

Adsorción de H_2 en superficies del $B_{12}N_{12}$

Plano [100]

Para este caso se tomó la estructura de [19] optimizada, a la cual se añadió el hidrógeno molecular sobre las caras hexagonales que se encuentran expuestas en la superficie del plano [100]. La posición de equilibrio del H_2 que resultó después del proceso de optimización se muestra en la Figura 11 donde se observa que el H_2 se ubica en una cavidad del $B_{24}N_{24}$ aledaña a las caras hexagonales superficiales.

De igual forma que en el sistema cristalino $B_{12}N_{12} + H_2$, se optimizó el modelo con los dos tipos de conjuntos base. La energía de amarre al realizar los cálculos con el conjunto base BSA es de 3.4 kJ/mol y cuando se realiza el mismo cálculo pero con el conjunto base BSB

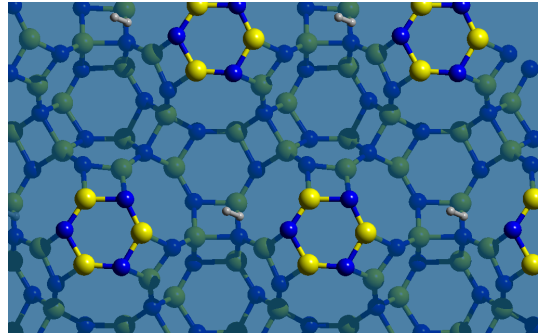


Figura 11: Vista superior del plano [100] con H_2 en su posición final (conjunto BSA)

se encontró una energía de amarre de 4.9 kJ/mol las cuales se encuentran en el rango de energías obtenidas para el H_2 adsorbido en sitios Bronsted de zeolitas con bajo contenido de aluminio [45].

Después de haber realizado la corrección BSSE se obtuvo para el conjunto base A una energía de amarre de -0.59 kJ/mol y para el conjunto base B se obtuvo -0.3 kJ/mol resultando interacciones repulsivas nuevamente.

Plano [110]

En este plano, la posición inicial del hidrógeno molecular fue sobre el centro de las caras octagonales expuestas en la superficie del plano [110] del sistema. La posición final del H_2 después de la optimización parcial se encontró sobre las caras octagonales pero ya no en la parte central, sino hacia uno de los vértices de los octágonos, como se puede observar en la Figura 12.

De igual forma que en el caso de los planos, la optimización se llevó a cabo con los dos tipos de conjuntos base. La energía de amarre al realizar los cálculos con el conjunto base BSA es de 0.1 kJ/mol y cuando se realiza el mismo cálculo pero con el conjunto base BSB se encontró una energía de amarre de 5.1 kJ/mol.

Después de la corrección BSSE se obtuvieron las siguientes energías de amarre; para el conjunto base A se obtuvo una energía de amarre de -0.3 kJ/mol y para el conjunto base B se obtuvo -0.5 kJ/mol.

Plano [112]

Para el análisis de este plano se procedió como en los anteriores. El H_2 fue colocado sobre las caras cuadradas expuestas en la superficie del plano [112] del sistema. La posición final del H_2 después de la optimización en este caso fue sobre uno de los vértices de la cavidad del $B_{24}N_{24}$, como se puede observar en la Figura 13.

La optimización se llevó a cabo con los dos tipos de conjuntos base. La energía de amarre al realizar los cálculos con el conjunto base BSA es de 14.5 kJ/mol y cuando se realiza el mismo cálculo pero con el conjunto base BSB se encontró una energía de amarre de 18.2 kJ/mol.

Después de la corrección BSSE se obtuvieron las siguientes energías de amarre; para el conjunto base A se

obtuvo una energía de amarre de 2.2 kJ/mol y para el conjunto base B se obtuvo 3.4 kJ/mol cercanas a los valores obtenidos para absorción de H_2 en zeolitas con alta baja relación Si/Al intercambiadas con litio [46]. Un resumen de las energías de amarre para las tres superficies analizadas se puede revisar en la Tabla 5 y además se puede observar las distancias entre el hidrógeno molecular y las superficies respectivas de los planos [100], [110] y [112], las cuales fueron calculadas entre el átomo de boro o nitrógeno de la superficie y el átomo de hidrógeno más cercano perteneciente a la molécula H_2 . La menor distancia se la puede encontrar con la superficie [112], lo cual sugiere que se tendrá la mayor energía de amarre con el hidrógeno molecular y por lo tanto presentará una mejor interacción H_2 – superficie.

Cálculos P-ONIOM

Los resultados de cálculos P-ONIOM se ajustan mejor a la realidad en cuanto a las energías de amarre existentes entre el sistema y el hidrógeno molecular ya que permite incluir de una manera aproximada los efectos de la correlación electrónica en la descripción del proceso de adsorción. En la Tabla 6 se puede observar las energías de amarre con corrección BSSE para cada combinación de nivel de teoría y conjunto base analizados para los diferentes modelos elaborados. Con los datos obtenidos de la Tabla 6, se calculó las energías de amarre usando el método P-ONIOM las cuales están reportadas en la Tabla 7.

Cálculos de frecuencias anarmónicas en el complejo $B_{12}N_{12} - H_2$

Los cambios anarmónicos de frecuencia del enlace H – H debido a sus interacciones con los sitios catiónicos se encuentran reportados en la Tabla 8, en donde se puede observar un corrimiento hacia el rojo, es decir que la adsorción de la sustancia se desplaza a longitudes de onda más grandes o de menor frecuencia, en cada uno de los casos, y en especial en el caso del corte [112]

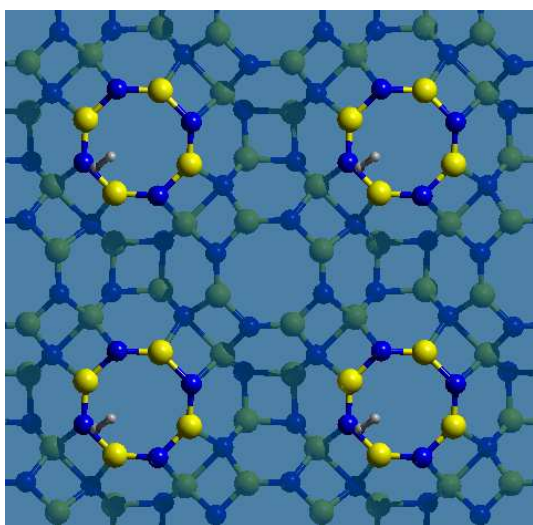


Figura 12: Vista superior del plano [110] con H_2 en su posición final (conjunto BSA)

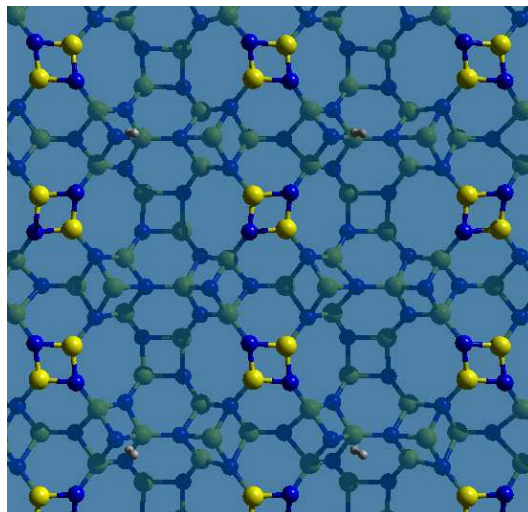


Figura 13: Vista superior del plano [112] con H_2 en su posición final (conjunto BSA)

donde se tiene una diferencia de 238.3 cm^{-1} analizado con el conjunto de funciones base B. Esto tiene relación entre las energías de amarre calculadas en la Tabla 8 con los cambios de frecuencia, donde el ejemplo más sobresaliente es en el corte [112], en comparación a los demás cortes, éste es el que presenta mayor energía de amarre de 4.99 kJ/mol a nivel MP2/aug-cc-pVTZ, lo que coincide con el mayor cambio de frecuencia anarmónica.

Conclusiones

Fueron estudiadas teóricamente las interacciones del hidrógeno molecular con el sistema cristalino $B_{12}N_{12}$ con un enfoque periódico a través del programa CRYSTAL09. Estos cálculos fueron llevados a cabo usando funcional B3LYP junto a conjunto de funciones base de diferente flexibilidad. En cuanto al análisis de los aspectos estructurales y energéticos de las moléculas adsorbidas de hidrógeno molecular sobre las caras de las superficies seleccionadas ([100], [110], [112]). Los cálculos fueron refinados utilizando el nivel de teoría MP2 en modelos seleccionados para la aplicación del método de corrección P-ONIOM.

Como un paso preliminar al estudio de las aplicaciones potenciales del cristal $B_{12}N_{12}$, se ha logrado describir de forma teórica utilizando cálculos DFT las propiedades estructurales, electrónicas y vibracionales de este material. De acuerdo a los resultados estructurales se puede observar que tanto los enlaces B-N como los ángulos B-N-B se encuentran en el rango de los valores típicos para estos átomos. Además a través del análisis de la matriz Hessiana de la geometría optimizada se muestra que la estructura representa un mínimo global en la superficie de energía potencial.

Mediante la inspección de los modos normales calculados para el $B_{12}N_{12}$, se identificaron seis zonas bien definidas en el espectro vibracional de este material, los cuales afectan a los enlaces de los diferentes anillos.

Superficies	BE ^c -BSA	BE ^c -BSB	Dist. de interacción	
	(kJ/mol)	(kJ/mol)	H ₂ - Superficie (BSA) (Å)	H ₂ - Superficie (BSB) (Å)
[100]	-0.59	-0.02	2.76	2.82
[110]	-0.29	-0.52	3.99	2.99
[112]	2.17	3.44	2.41	2.48

Tabla 5: Energías de amarre libres de BSSE y distancias de interacción para la interacción del H₂ con los planos [100], [110], [112]

Modelos	BE ^c -BSA (kJ/mol)			BE ^c -BSB (kJ/mol)		
	[100]	[110]	[112]	[100]	[110]	[112]
Conjuntos base						
B3LYP/Crystal09	-1.07	-0.21	0.51	-0.68	-1.26	1.05
B3LYP/aug-cc-pVDZ	-1.66	-0.37	-0.76	-1.38	-1.85	-0.08
B3LYP/aug-cc-pVTZ	-1.63	-0.31	-0.49	-1.34	-1.86	0.16
MP2/Crystal09	-0.16	0.39	0.25	0.97	1.11	2.13
MP2/aug-cc-pVDZ	1.06	1.04	1.11	1.17	1.62	1.84
MP2/aug-cc-pVTZ	1.46	1.10	2.01	1.53	2.05	2.60

Tabla 6: Energías de amarre con corrección BSSE de los modelos elaborados analizados con las diferentes combinaciones de niveles de teoría y conjuntos base

Modelos	BE ^c P-ONIOM-BSA (kJ/mol)			BE ^c P-ONIOM-BSB (kJ/mol)		
	[100]	[110]	[112]	[100]	[110]	[112]
Niveles altos						
B3LYP/aug-cc-pVDZ	-1.18	-0.44	0.90	-0.71	-1.11	2.31
B3LYP/aug-cc-pVTZ	-1.15	-0.38	1.17	-0.68	-1.12	2.55
MP2/Crystal09	0.32	0.32	1.91	1.64	1.85	4.52
MP2/aug-cc-pVDZ	1.54	0.97	2.79	1.83	2.36	4.23
MP2/aug-cc-pVTZ	1.94	1.03	3.67	2.19	2.79	4.99

Tabla 7: Energías de amarre con corrección BSSE de los modelos elaborados analizados con las diferentes combinaciones de niveles de teoría y conjuntos base

	Frecuencia	Δω
	Anarmónica ω (cm ⁻¹)	(cm ⁻¹)
H molecular	4235.3	-
Superficie [100] (BSA)	4208.8	-26.5
Superficie [110] (BSA)	4231.4	-3.9
Superficie [112] (BSA)	4063.2	-172.1
Superficie [100] (BSB)	4137.1	-98.2
Superficie [110] (BSB)	4147.5	-87.8
Superficie [112] (BSB)	3997.0	-238.3

Tabla 8: Frecuencias anarmónicas del hidrógeno molecular de los sistemas en estudio

Estos anillos pueden contraerse, estirarse y doblarse lo cual ayudan a que una molécula huésped pueda a través estos anillos y así logre llegar a su lugar de anclaje.

En cuanto a los cálculos de densidad electrónica, se pudo observar que en el sistema existen zonas o cavidades en las cuales se pueden almacenar moléculas huéspedes. Estas zonas son las esferas formadas por el B₂₄N₂₄ las cuales poseen una densidad electrónica propicia para el alojamiento del hidrógeno molecular.

Se estudiaron tres superficies en los planos [100], [110] y [112] que corresponden a las caras hexagonales, octagonales y cuadradas, respectivamente. Se encontró que el plano con más probabilidad de formarse es el [100] debido a que presenta la menor energía de formación. Además se pudieron evidenciar sitios o cavidades capaces de anclar al hidrógeno molecular. Sin embargo, después de analizar los datos obtenidos de las energías

de amarre corregidas entre el sistema y el H₂, reportados en las Tablas 6 y 7, se puede concluir que la superficie [112] es la que presenta el mejor ambiente de adsorción para H₂. Además estos resultados concuerdan con el análisis anarmónico realizado puesto que este plano es el que presenta mayor corrimiento hacia el rojo. Cabe recalcar que si bien la superficie [112] presenta una gran afinidad con el hidrógeno molecular, está así mismo es el plano más inestable, lo cual es un factor adicional que beneficia a la adsorción del H₂.

Referencias

- [1] Botas, J.; Calles, J.; Dufour, J. 2005. "La Economía Del Hidrógeno - Una Visión Global sobre la Revolución Energética del Siglo XXI". *Revista de la Asociación Española de Científicos*, 9.
- [2] Cox, P.; Betts, R.; Jones, C.; Spall, S. 2000. "Accelera-

- tion of Global Warming Due to Carbon-Cycle Feedbacks in a Coupled Climate Model". *Nature*, 408:184 – 187.
- [3] Tans, P.; Fung, I.; Takahashi, T. 1990. "Observational Constraints on the Global Atmospheric CO₂ Budget". *Science*, 247:1431 – 1438.
- [4] Fyfe, D. 2011. "Oil Market Report". *IEA*, 1.
- [5] UNICS. 2007. "Global Warming Solutions". *Union of Concerned Scientists*, 1.
- [6] BP. 2011. "Statistical Review of World Energy Full Report". *B. Dudley*, 1.
- [7] Boden, T.; Marland, G.; Andres, R. 2009. "Global, Regional, and National Fossil-Fuel CO₂ Emissions". *Carbon Dioxide Information Analysis Center*, 1.
- [8] Dunn, S. 2002. "Hydrogen futures: toward a sustainable energy system". *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(3):235 – 264.
- [9] Bossel, U.; Eliasson, B. 2006. "Energy and the Hydrogen Economy". *ABB Switzerland Ltd. Corporate Research: Switzerland*, 1.
- [10] Brown, T. 2004. "Química: la ciencia central". *Pearson Educación*, 1.
- [11] DOE. 2009. "Targets for Onboard Hydrogen Storage Systems for Light-Duty Vehicles". *Office of Energy Efficiency and Renewable Energy and The FreedomCAR and Fuel Partnership*, 1.
- [12] DOE. 2011. "Hydrogen Program". *Hydrogen, Fuel Cells and Infrastructure Technologies Program*, 1.
- [13] Gaps, R. 2006. "Hydrogen - Production and Storage". *Hydrogen Implementing Agreement*, 1.
- [14] Essentials, I. 2007. "Hydrogen Production & Distribution". *IEA*.
- [15] van der Berg, A.; Otero, C. 2008. "Materials for Hydrogen Storage: Current Research Trends and Perspectives". *Chem. Commun.*, 1:668 – 681.
- [16] Jacobser, N. 2009. "Nanotechnology". *Chemistry Central Journal*, 12:245 – 248.
- [17] Maubert, M.; Soto, L.; León, A.; Flores, J. 2008. "Nanotubos de Carbono - La era de la nanotecnología". *Área de Química de Materiales - Universidad Autónoma Metropolitana*, 1.
- [18] Whitesides, G. 2005. "Nanoscience, Nanotechnology, and Chemistry". *Nanoscience and chemistry*, 2(1):172–179.
- [19] Matxain, J.; Eriksson, L.; Mercero, J.; Lopez, X.; Piris, M.; Ugalde, J. 2007. "New Solids Based on B₁₂N₁₂ Fullerenes". *J. Phys. Chem.*, 111:13354 – 13360.
- [20] Oku, T.; Nishiwaki, A.; Narita, I. 2004. "Formation and Atomic Structure of B₁₂N₁₂ Nanocage Clusters Studied by Mass Spectrometry and Cluster Calculation". *Science and Technology of Advanced Materials*, 5(6):635 – 638.
- [21] Schlegel, H. 1982. "Optimization of equilibrium geometries and transition structures". *J. Comp. Chem.*, 3:214 – 218.
- [22] Civalleri, B. 2001. "Hartree - fock geometry optimization of periodic systems with the crystal code". *Chem. Phys. Lett.*, 348:131 – 138.
- [23] Torres, F. 2007. "Quantum Mechanical Study of Hydrogen Storage in Microporous Materials". *Dipartimento di Chimica IFM2007, Università degli Studi di Torino*, 1.
- [24] Becke, A. 1993. "Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange". *J. Chem. Phys.*, 98:5648 – 5652.
- [25] Koch, W.; Holthausen, M. 2001. "A Chemist's Guide to Density Functional Theory". *Wiley - VCH*, 1.
- [26] Ugliengo, P.; Busco, C.; Civalleri, B. 2005. "Carbon monoxide adsorption on alkali and proton - exchanged chabazite: An ab initio periodic study using the CRYSTAL code". *Mol. Phys.*, 103:2559 – 2571.
- [27] Islam, M.; Bredow, T.; Minot, C. 2006. "Comparison of trigonal B₂O₃ structures with high and low space-group symmetry". *Chem. Phys. Lett.*, 418:565 – 568.
- [28] Dovesi, R. 1990. "Ab initio approach to molecular crystals: a periodic Hartree-Fock study of crystalline urea". *J. Chem. Phys.*, 92:7402 – 7411.
- [29] Gatti, C.; Saunders, V.; Roetti, C. 1994. "Crystal-field effects on the topological properties of the electron-density in molecular-crystals - the case of urea". *J. Chem. Phys.*, 101:10686 – 10696.
- [30] Dovesi, R. 1983. "Hartree - Fock study of lithium hydride with the use of polarizable basis set". *Phys. Rev. B*, 29:3591 – 3600.
- [31] Tonigold, K.; Groß, A. 2010. "Adsorption of small aromatic molecules on the (111) surfaces of noble metals: A density functional theory study with semiempirical corrections for dispersion effects". *Journal of Chemical Physics*, 132:1 – 10.
- [32] Ortman, F.; Bechstedt, F. 2006. "Semiempirical van der Waals correction to the density functional description of solids and molecular structures". *Phys. Rev. B*, 73:1 – 10.
- [33] Silvestrelli, P. 2008. "Van der Waals interactions in DFT made easy by Wannier functions". *Dipartimento di Fisica "G. Galilei Università di Padova*.
- [34] Boys, S.; Bernardi, F. 2002. "The Calculation of Small Molecular Interactions by the Differences of Separate Total Energies. Some Procedures with Reduced Errors". *Molecular Physics*, 100:65 – 73.
- [35] Roggero, I.; Civalleri, B.; Ugliengo, P. 2001. "Modeling physisorption with the ONIOM method: the case of NH₃ at the isolated hydroxyl group of the silica surface". *Chemical Physics Letters*, 341:625 – 632.
- [36] Dovesi, R. 2009. "CRYSTAL09". *User's Manual*, 1.

- [37] Hamad, S.; Catlow, R.; Matxain, J.; Ugalde, J. 2005. "Structure and Properties of ZnS Nanoclusters". *J. Phys. Chem.*, 109:2703 – 2709.
- [38] Narita, I.; Nishiwaki, A.; Oku, T. 2004. "Formation and Atomic Structure of B₁₂N₁₂ Nanocage Clusters Studied by Mass Spectrometry and Cluster Calculation". *ScienceDirect*, 5(6):635 – 638.
- [39] Ashcroft, N.; Mermin, N. 1976. "Solid state physics". *Saunders College*, 1.
- [40] Eisberg, R.; Resnick, R. 1992. "Física Cuántica - Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos y Partículas". *Turtleback Books*, 1.
- [41] Tang, C. 2002. "Multiwalled Boron Nitride Nanotubes: Growth, Properties, and Applications". *J. Am. Chem. Soc.*, 124:1450.
- [42] Ma, R. 2002. "Hydrogen Uptake in Boron Nitride Nanotubes at Room Temperature". *J. Am. Chem. Soc.*, 124: 7672 – 7673.
- [43] Oku, T.; Nishiwaki, A.; Narita, I. 2004. "Formation and atomic structures of B_nN_n (n=24-60) clusters studied by mass spectrometry, high-resolution electron microscopy and molecular orbital calculations". *Physica B*, 351:184.
- [44] Koi, N. 2005. "Formation and Atomic Structure of Boron Nitride Nanotubes with Cup-Stacked and Fe Nanowire encapsulated Structures". *Diamond Relat. Mater.*, 14:1190.
- [45] Torres, F. 2006. "An Ab Initio Periodic Study of Acidic Chabazite as a Candidate for Dihydrogen Storage". *J. Phys. Chem. B*, 110:10467 – 10474.
- [46] Civalleri, B. 2008. "Ab Initio investigation of the interaction of H₂ with lithium exchanged low-silica chabazites". *Journal of Physics*, 117:012012.

Influence of the wind direction variability on the quantification of tephra fallouts: December 2012 and March 2013 Tungurahua eruptions

Benjamin Bernard^{1*}, Jorge Bustillos², Bridget Wade^{1,3} y Silvana Hidalgo²

¹Universidad San Francisco de Quito, Colegio Ciencias e Ingeniería - el Politécnico. Diego de Robles y Vía Interoceánica, Campus Cumbayá, Casa Tomate. Casilla Postal 17-1200, Quito, Ecuador.

²Instituto Geofísico, Escuela Politécnica Nacional de Quito. Calle Ladrón de Guevara E11-253. Casilla Postal 17-2759, Quito, Ecuador.

³Juniata College. 1700 Moore Street. Casilla Postal 16652, Huntingdon, United States of America.

*Autor principal/Corresponding author, e-mail: bbernard@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: Cesar Zambrano, Ph.D.

Recibido/Received: 02/05/2013. Aceptado/Accepted: 30/05/2013.

Publicado en línea/Published on Web: 28/06/2013. Impreso/Printed: 06/06/2013.

Abstract

The quantification of tephra fallouts can be affected by different parameters such as the quality of the deposit exposure and the calculation method. In this paper the effect of variability in the wind direction is investigated through the analysis of two eruptions from the Tungurahua volcano in Ecuador. The fluctuation in the wind direction was assessed using the alerts generated by the Washington VAAC (Volcanic Ash Advisory Center) and the actual fallout reports from local volunteers. Area densities (mass/area) of the tephra deposits were compiled by each co-author to create isomass maps. Empirical methods were used to calculate the total mass of the tephra fallouts. With this approach we were able to study the influence of the wind direction variability on the quantification of tephra fallouts under similar eruptive and sampling conditions. Our results indicate that, due to higher wind direction variability, the December 2012 eruption produced a non-elliptical complex deposit with a larger uncertainty on the calculated total mass value. The March 2013 eruption, on the other hand, occurred during a period of steady wind direction and left an almost elliptical deposit. The compilation of the data from the March eruption done by the co-authors demonstrates greater coherence and a less uncertainty in the final result. This study highlights that the choice of the empirical law to describe the fallout distribution must be adapted according to the map of the deposit.

Keywords. Fallout quantification, wind direction, Tungurahua, isomass maps, tephra, physical volcanology.

Resumen

La cuantificación de caídas de tefra puede ser afectada por diferentes parámetros, tales como la calidad de exposición de los depósitos y los métodos de cálculo. En este trabajo se investiga el efecto de la variabilidad de la dirección del viento a través del análisis de dos erupciones del volcán Tungurahua (Ecuador). La fluctuación de la dirección del viento se analizó usando los reportes de la Washington VAAC (Volcanic Ash Advisory Center) y los reportes de caída de ceniza real proporcionados por los vigías del volcán. Los datos de densidad areal (masa/área) de los depósitos de tefra fueron compilados por cada uno de los co-autores para la realización de los mapas de isomasas. Se utilizó métodos empíricos para calcular la masa total de la caída de tefra. Por primera vez ha sido posible estudiar la influencia de la variabilidad de la dirección del viento en la cuantificación de la caída de ceniza bajo similares condiciones eruptivas y de recolección de muestras. Los resultados de este trabajo muestran que, debido a una mayor variabilidad de la dirección del viento, la erupción de diciembre de 2012 produjo un depósito complejo cuyas isomasas tienen formas no elípticas con una mayor incertidumbre en el valor de la masa total. Por el contrario, la erupción de marzo 2013 se produjo durante un período en el que la dirección del viento fue constante y dejó un depósito de forma casi elíptica. La recopilación de los datos de marzo realizadas por los co-autores muestra una mayor coherencia y por lo tanto una menor incertidumbre en el resultado final. Finalmente, este trabajo destaca el hecho de que la elección de la ley empírica para describir la distribución del depósito debe tomar en cuenta el mapa del mismo.

Palabras Clave. Cuantificación de caída, dirección del viento, Tungurahua, mapas de isomasas, tefra, vulcanología física.

Introduction

The total volume and mass of tephra fallouts are essential volcanological data since they provide significant insight into the magnitude and explosivity of a volcanic eruption [1]. This information is also used in numerical modeling to facilitate the forecasting of volcanic plume dispersal and tephra fallouts [2]. The most widely used methodology to calculate total volume and mass of fallouts is based on a three step procedure: 1) measurements of thickness and area density (mass/area) of the tephra deposit in different locations; 2) interpretation and compilation of the data into isopach and isomass maps; 3) calculation using empirical laws that describe the distribution of the deposit around the vent [3–5]. This procedure can be affected by a large number of parameters such as the quality of the field data, the uncertainty in the isopach and isomass map compilation, and the empirical law used (e.g. exponential versus power-law). Several studies with a primary focus on the availability of data and the accuracy of the empirical laws have been carried out to assess the uncertainty of fallout volume calculation [6, 7]. Nevertheless some aspects of this quantification process are still sidelined from the scientific debate.

Volcanic plumes responsible for tephra fallout are affected by the wind and will ideally produce an elliptical deposit with the main axis of the ellipse corresponding to the main wind direction and one focus of the ellipse encompassing the volcanic vent [3]. This characteristic was used to define the first commonly accepted empirical law based on the apparent exponential thinning of the deposit away from the vent [3]. The direction of the wind may shift over the course of an eruption, especially for long lasting eruptions, affecting the distribution of the tephra deposit around the volcano and therefore changing the shape of the isopachs and isomasses. If this aspect has already been assessed to produce more reliable empirical laws [4], it has never been investigated for its effects on the interpretation of the data and drawing of the deposit maps. Therefore, this paper proposes to study the influence of the wind direction variability on the calculation of the total mass and volume of tephra.

To assess the effects of the wind on this quantification, it is important to compare eruptions with similar size and sampling networks. The Tungurahua volcano (Ecuador) has been in eruption for almost 14 years, repeatedly producing tephra fallout that affect thousands of square kilometers [8, 9]. Since 2007, Tungurahua tephra deposits have been systematically sampled due to the establishment of a network of ash collectors [10, 11]. This network has recently been expanded to include a more distal area and modernized with the use of homemade ashmeters that permit more accurate and systematic measurements [12]. Tungurahua's eruption is not continuous and since 2008 the volcano has presented short to medium-lived eruptions, spanning from a few days to

a few weeks, and separated by periods of quiescence ranging from two to six months. These periods of inactivity permit detailed studies of each precedent eruptive period and associated tephra deposits. In the Eastern Cordillera of Ecuador, where the Tungurahua volcano is located, the wind mainly blows from the Amazonian basin to the Pacific Ocean (east to west) most of the year. However, it is common to have much variable wind directions between November and January. Eruptions occurring at different periods of the year produce volcanic plumes carried in different directions due to changing atmospheric currents.

Methodology and sampling

For this study we analyzed the last two eruptions from Tungurahua, in December 2012 and March 2013. Both eruptions lasted for approximately the same amount of time, 17 and 18 days respectively, with millimeter-thick deposits in the proximal area. It is extremely difficult to obtain precise meteorological data in Ecuador due to the scarcity of meteorological stations as well as the complexity of the atmospheric stratification resulting from geography and topography. During an eruption the wind direction can be inferred from observations of the volcanic plume direction and from the pattern of tephra fallout. We used two independent sources of information to study the wind direction variability: 1) the Washington VAAC (Volcanic Ash Advisory Center) which emits alerts whenever a volcanic plume is identified by airplane pilots or on satellite images; 2) the Tungurahua Volcano Observatory of the IG-EPN (Instituto Geofísico de la Escuela Politécnica Nacional) which compiles observations on tephra fallout around the volcano from a network of local volunteers. This information is plotted in rose diagrams in order to determine the principal directions of dispersion of the volcanic plume and tephra fallout.

Two field missions, from the 11th to the 13th of January (December 2012 eruption) and from the 27th to the 28th of March (March 2013 eruption), were carried out to collect the tephra accumulated in the ashmeters. For the March 2013 eruption some samples from the northernmost region of the network were collected during the first week of April. Thickness readings were made directly in the field, and the samples were dried at 40°C and weighed in the Universidad San Francisco de Quito geology laboratory. The data was collected in 42 and 47 locations for the December 2012 and March 2013 eruptions respectively. The most proximal datapoint is 6 km from the vent and the most distal datapoint is 32 km from the vent. Area density (mass/area) was calculated in all sites with a 1 g/m² precision to compile isomass maps and calculate the eruptions' total mass of tephra. Thickness readings were possible only in few places (7 and 12 locations for the December 2012 and March 2013 eruptions respectively) due to the lower limit of the ashmeter scale (0.3 mm). Thickness measurements were used to calculate bulk densities in or-

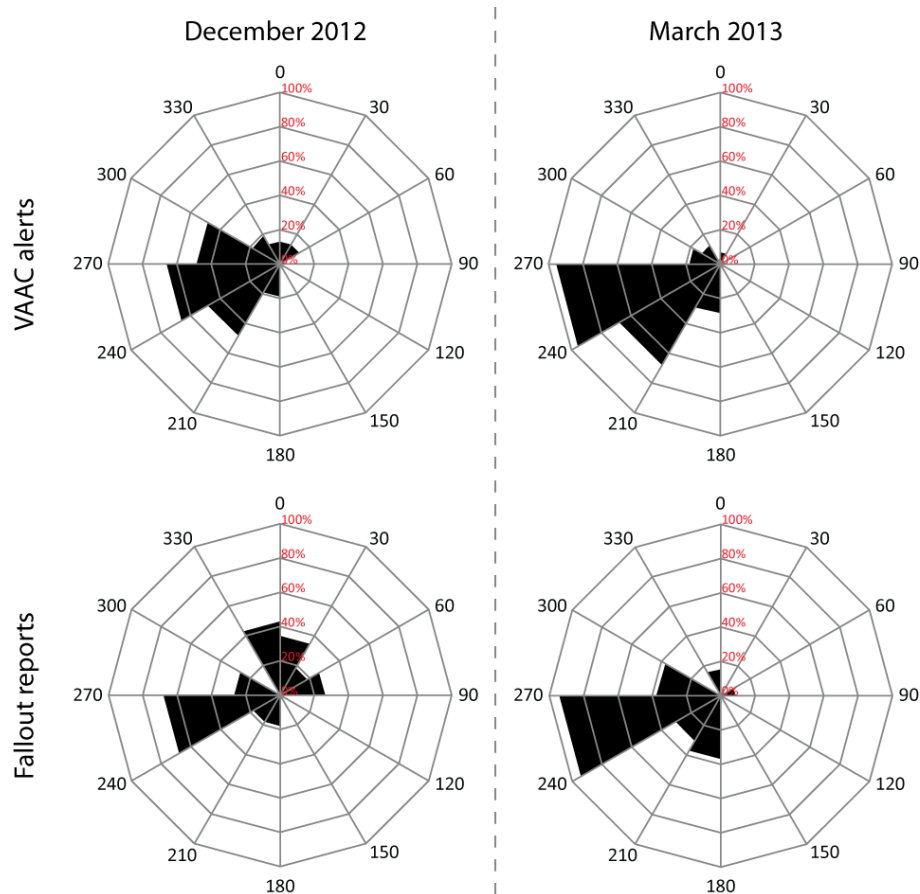


Figure 1: Rose diagrams of the Washington VAAC alerts (source: www.ospo.noaa.gov) and the fallout reports (source: www.igepn.edu.ec) for the December 2012 and March 2013 Tungurahua eruptions

der to ultimately estimate the eruptions' total volume of tephra. The isomass maps were drawn on a geospatial processing program for each eruption by each of the co-authors without exchange of information other than the raw database. Each co-author has a different approach and background in drawing isomass maps.

In the past 25 years, several models using isopach and isomass maps have been proposed to calculate the total volume and mass of tephra fallouts [3–6, 13]. These models involve the best fitting of thinning data using empirical laws (i.e., exponential law with one or more segments, power law, Weibull function) on semilog plots of thickness (or area density) versus square root of isopach (or isomass) area. Ultimately, the choice of the empirical law is based on the availability of data and the pattern of thinning of the tephra deposit.

Results

Volcanic plume directions and fallout reports

During the December 2012 eruption, the plume direction reported by the Washington VAAC and the fallout observations reported by local volunteers indicate that the eruption affected a very wide range of sectors (Figure 1). The plume directions are concentrated to the west of the volcano, from SW to WNW, although more

than 10% of the days have plumes drifting to the north and to the south. The fallout reports exhibit a slightly different distribution with zones heavily affected by ash fall to the WSW and NNW. For more than 20% of the days, significant fallouts were also reported in the WNW, NNE and ENE quadrants. There are some discrepancies between the information obtained from the Washington VAAC and the fallout reports, especially for the northern and eastern sectors. These differences can be associated with the timing of the changes in wind direction and the atmospheric conditions. The wind blew north and north-east with dry atmospheric conditions and heavy tephra fall at the beginning of the eruption. After three days, the wind direction shifted gradually west coinciding with a slight decrease in the rate of fallout. It is therefore probable that parts of the reports from the northern and eastern sectors are attributed to episodes of remobilization of the tephra deposits, affecting the populated area even if the actual volcanic plume drifted westward. Another possible explanation for the discrepancy is that, given the cloud coverage during this period of the year, the Washington VAAC was unable to identify part of the low altitude plumes that drifted north and east.

For the March 2013 eruption, the VAAC alerts and fallout reports both coincide neatly, manifesting a narrower range of sectors affected by the tephra fallout. The WSW

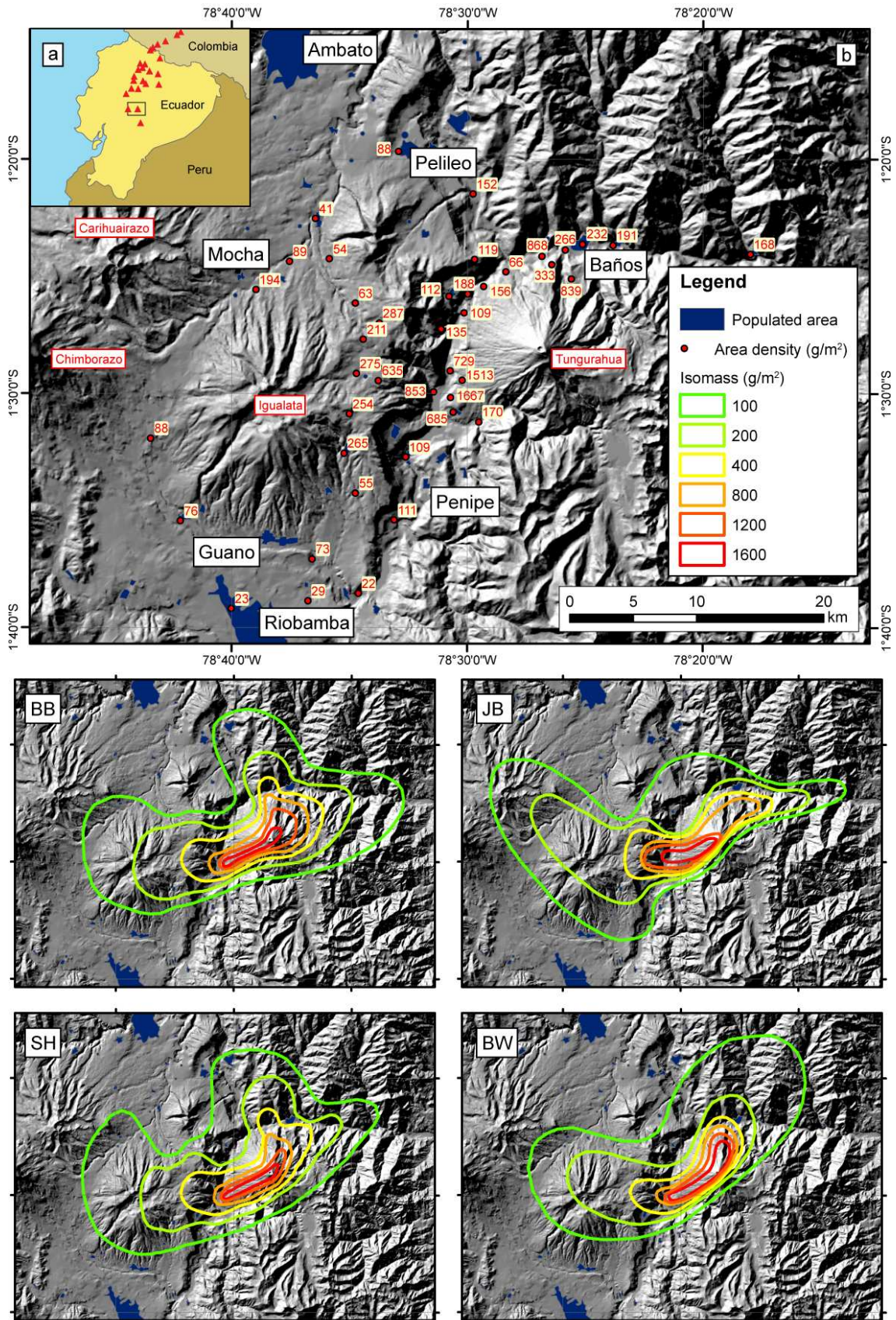


Figure 2: Location map of Tungurahua volcano in the Ecuadorian Volcanic Arc. b. Shaded relief map of the sampling network with the area density value (in g/m²) of the December 2012 Tungurahua eruption. BB, JB, SH, BW: isomass maps named after the initials of the co-authors of this study. In black: names of the main towns of the area. In red: names of the main volcanoes in the area.

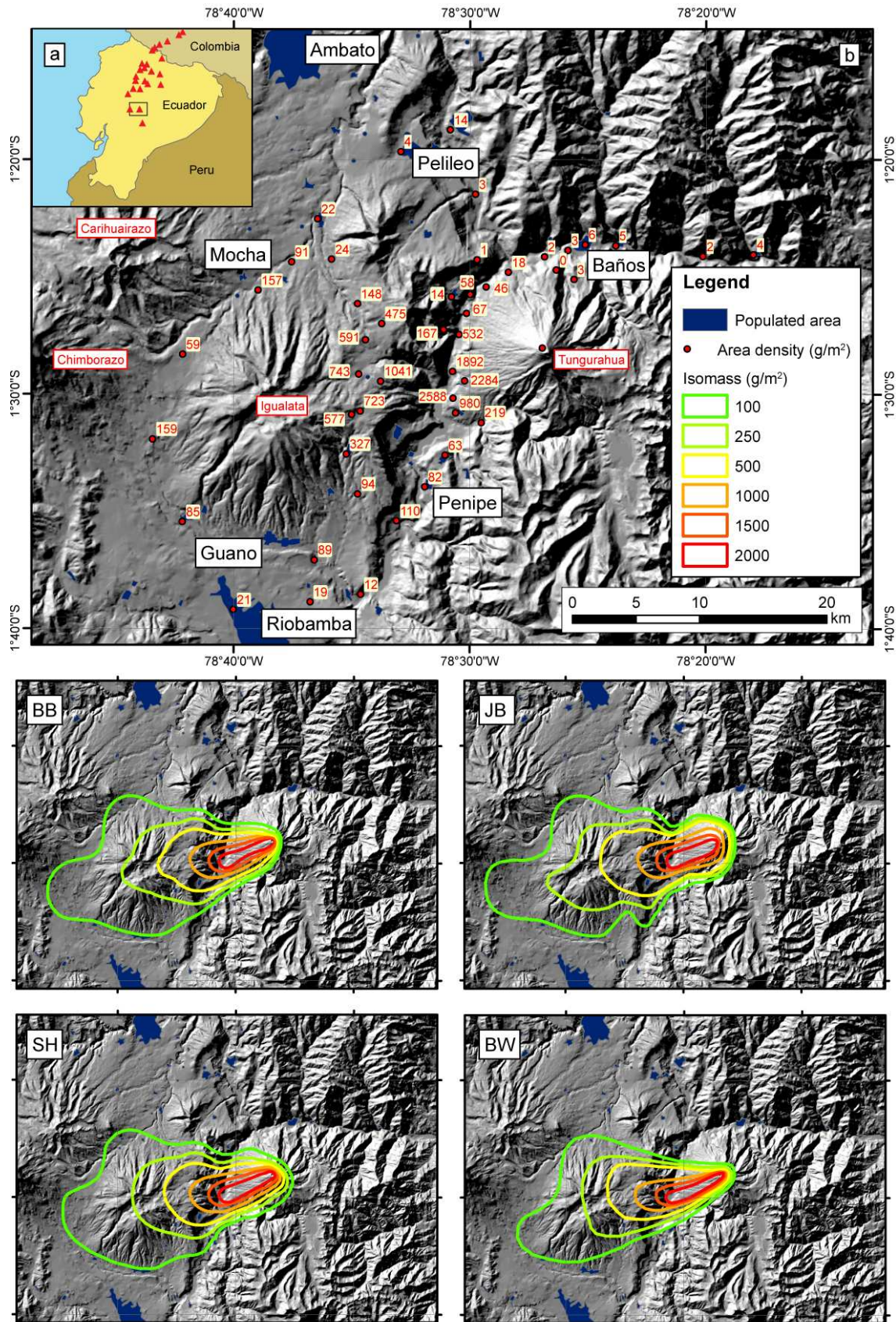


Figure 3: Location map of Tungurahua volcano in the Ecuadorian Volcanic Arc. b. Shaded relief map of the sampling network with the area density value (in g/m²) of the March 2013 Tungurahua eruption. BB, JB, SH, BW: isomass maps named after the initials of the co-authors of this study. In black: names of the main towns of the area. In red: names of the main volcanoes in the area.

sector is clearly the most affected with more than 90% of the days displaying both VAAC alerts and fallout reports. Fallouts were also reported in the WNW, SW and SSW quadrants more than 30% of the days, in agreement with the VAAC alerts. Apparently the northern and eastern sectors were not affected by this eruption.

For both eruptions there is no fallout report in the ESE-SSE sectors due to the absence of volunteers in these regions. However, the Washington VAAC did not report any volcanic plumes in those directions; so no mislead will be introduced in the interpretation of the data.

Field data and isomass maps

For the December 2012 eruption, the calculated area densities range from 22 to 1667 g/m² with a maximum thickness of 1.3 mm measured in El Manzano village. Accordingly, the deposit maps for this eruption were drawn using 100, 200, 400, 800, 1200, and 1600 g/m² isomass values (Figure 2). The March 2013 tephra deposit has a wider range of area densities (0 to 2588 g/m²) with a maximum thickness of 2.0 mm also measured in El Manzano. We chose 100, 250, 500, 1000, 1500, and 2000 g/m² isomass values to draw the deposit maps corresponding to this eruption (Figure 3).

The isomass maps compiled by the four co-authors for the December 2012 eruption vary in fallout dispersal direction. The BB and SH maps have three similar fallout dispersal directions (W, N, and E) while the JB and BW maps have only two (W and E, W and NE respectively). The contours of the isomasses present some discrepancies between the four maps as there are irregular contours in the BB and SH maps and smooth contours in the JB and BW maps (Figure 2). In spite of these aesthetic differences, the area of each isomass in all four maps is relatively similar.

In comparison, the isomass maps for the March 2013 eruption are much more consistent with a single direction of fallout dispersal toward the WSW. The shape and the area of the isomasses are also quite similar, however, the JB map has noticeably irregular contours while the BW map is the smoothest (Figure 3).

Total mass calculation

The semilog plots of area density versus square root of isomass area establish that the data from the maps of both eruptions are equally scattered (Figure 4). The empirical law chosen to calculate the total mass of the fallouts is based on the shape of the data series and the availability of proximal and distal datapoints. The lack of very proximal (< 6 km) and very distal (> 32 km) datapoints makes the use of the power-law formula unsuitable [6]. Additionally, the power-law exponent calculated for all the isomass maps is <2, which is known to produce an even larger uncertainty [14]. Because most of the data series does not permit the identification of one (or more) sharp breaks of slope, we used the single segment exponential law corrected for non-elliptical

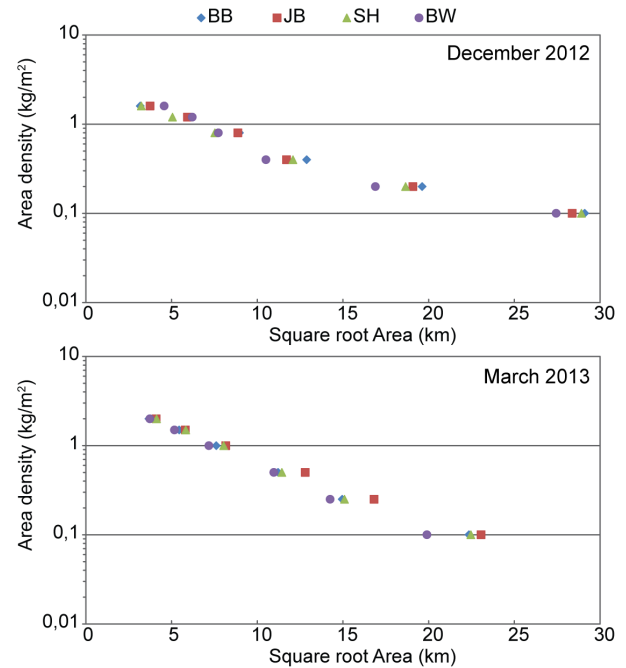


Figure 4: Semilog plots of area density versus square root of isomass area for the December 2012 and March 2013 Tungurahua fallouts. BB, JB, SH, BW: data series corresponding to the isomass maps in Figures 2 and 3.

isomasses [3, 4] and the Weibull function [13] to fit the field data.

The coefficient of determination (R^2) is a statistical parameter used to illustrate the fit between the data series and the empirical law. For both eruptions, the Bonadonna and Costa method [13] gives the best R^2 values (Table 1), which is expected as the Weibull function calculates the best fit regression law based on a range of independent empirical parameters. Good R^2 values are obtained using the Pyle method [3] for the March 2013 eruption while it produced less than ideal results for the December 2012 eruption. It is important to note that excellent R^2 values do not necessarily imply that the total mass calculation is closer to the reality. A simple statistical analysis of the results, using average and standard deviation, reveals that the quantification of the December 2012 eruption has much more scattered values than the March 2013 eruption. The variation on the total mass value reaches 102% for the December 2012 eruption while it reaches only 37% for the March 2013 eruption.

Total volume estimation

Based on the results presented in Table 1, there are different ways to estimate the total mass of Tungurahua fallouts. The March 2013 results display a small scattering of data even between the two empirical methods and, for this reason, we propose to use the full mass range. For the December 2012 eruption the Bonadonna and Costa method [13] appears to better represent the data series so we propose to use only those results with a more selective mass range.

Co-author	December 2012				March 2013			
	Pyle 1989, Fierstein and Nathenson 1992		Bonadonna and Costa 2012		Pyle 1989, Fierstein and Nathenson 1992		Bonadonna and Costa 2012	
	Total mass (10 ⁸ kg)	R ²	Total mass (10 ⁸ kg)	R ²	Total mass (10 ⁸ kg)	R ²	Total mass (10 ⁸ kg)	R ²
BB	3.42	0.977	3.59	0.981	2.56	0.991	2.77	0.994
JB	3.23	0.964	3.90	0.983	2.96	0.998	3.06	0.999
SH	3.19	0.967	3.80	0.993	2.68	0.989	3.01	0.994
BW	2.89	0.925	5.84	0.991	2.23	0.998	2.34	0.999
Average	3.18		4.28		2.61		2.80	
Standard deviation	0.22		1.05		0.30		0.33	
Full mass range	[2.89-5.84] 10 ⁸ kg				[2.23-3.06] 10 ⁸ kg			
Selected mass range	[3.59-5.84] 10 ⁸ kg				[2.23-3.06] 10 ⁸ kg			
Average bulk density	1273±73 kg/m ³ [7]				1314±84 kg/m ³ [12]			
Volume range	[2.82-4.59] 10 ⁵ kg				[1.70-2.33] 10 ⁵ kg			

Table 1: Total mass and volume quantification of the December 2012 and March 2013 Tungurahua fallouts. R²: coefficient of determination. BB, JB, SH, BW: initials of the co-authors of this study. Between []: number of thickness readings used to calculate the average bulk density and its standard deviation.

Bulk densities calculated with thickness measurements for both eruptions gave consistent results and were used to estimate the volume of the tephra fallouts. Using the selected mass range for the December 2012 eruption (3.59-5.84·10⁸ kg) and the average bulk density of the deposit measured in 7 locations (1273 ± 73 kg/m³), the total volume is estimated between 2.82 and 4.59 10⁵ m³. The same estimation was done for the March 2013 eruption (2.23-3.06 10⁸ kg, 1314 ± 84 kg/m³ calculated with 12 thickness readings) and gives a total volume between 1.70 and 2.33 10⁵ m³. According to the total volume of tephra, both eruptions can be qualified as VEI 1 (Volcanic Explosivity index, [1]).

Discussion

Does wind direction variability affect isomass map compilation?

According to Biass and Bonadonna [7], the compilation of isopach (and isomass) maps relies mostly on the quality of the deposit exposure. In our case, the deposit exposure is almost the same between the two eruptions (42 and 47 data point in December 2012 and March 2013 respectively). Furthermore, the use of the ashmeters creates more homogeneous sampling conditions, drastically reducing the influence of weathering processes [12]. Our data clearly establishes that the wind direction was more variable during the December 2012 eruption (W, N, and E) than during that of March 2013 (WSW) (Figure 1). This information can also be partially deduced from the isomass maps (Figure 2 and 3) even with some discrepancies between each co-author's interpretations. The isomass maps from the December 2012 eruptions exhibit a wider variety of main dispersion axes, isomass shape, and roughness. We attribute these features to the difficulty in drawing non-elliptical isomass curves, allowing more subjective interpretations of the field data. Some authors attribute a 10% error to the compilation process [7, 13] but this study affirms

that the wind direction variability must be considered as an important factor in the error estimation.

How does the choice of the empirical method influence the total mass calculation?

The total mass of Tungurahua eruptions has been calculated using two different empirical methods. For the March 2013 fallout the difference between the one segment exponential law and the Weibull function is always around 10%. For the December 2012 eruption this difference increased to more than 100% in some cases. The Pyle method [3], even used with the corrected formula [4], typically underestimates the total mass of the tephra deposit [7] but this trend is amplified in the case of a complex non-elliptical deposit. Therefore, the Pyle method [3] should be used only for preliminary estimates in restricted cases when the wind direction is fairly constant during the eruption. In general, the Weibull function [13] seems to represent better the data series even if the standard deviation for the December 2012 fallout total mass is greater than with the Pyle method [3].

Conclusions

The eruptive plumes of December 2012 and March 2013 from the Tungurahua volcano were affected by different atmospheric currents. The VAAC alerts and IGEPN fallout reports indicate that the December eruptive period displayed a wide variation of wind direction (W, N, and E) while the March episode presented a steady wind direction (WSW). The study of the tephra deposits proves that the variability of the wind direction greatly influences the quantification procedure. In particular, our results highlight that a higher variability of the wind direction during the eruption will produce a greater degree of subjective interpretation of the field data during the map compilation process. This paper also illustrates the sensitivity of some empirical methods to the shape of the deposit maps which can lead to an underestimate

of the fallout volume (or mass). Tephra fallout quantification is a complex procedure based primarily on the interpretation of field data and it should always include a critical analysis of the final results and an estimation of the uncertainty.

Acknowledgements

The authors thank the Universidad San Francisco de Quito for logistic support. We would like to thank the personnel of the Tungurahua Volcano Observatory of the Instituto Geofísico de la Escuela Politécnica Nacional for the help during the field work. The authors also would like to thank the volunteers around Tungurahua volcano for providing the daily information on the tephra fallouts. The authors acknowledge W. Merino for his participation in the collection of field-data. Daniel Andrade is acknowledged for its constructive and thorough reviews.

References

- [1] Newhall, C.; Self, S. 1982. "The volcanic explosivity index (VEI): an estimate of explosive magnitude for historical volcanism". *Journal of Geophysical Research*, 87:1231–1238.
- [2] Suzuki, T. 1983. "A theoretical model for dispersion of tephra". in: D. Shimozuru and I. Yokoyama (eds) *Arc Volcanism: Physics and Tectonics*, Terra Scientific Publishing, Tokyo, 95–116.
- [3] Pyle, M. 1983. "The thickness, volume and grain-size of tephra fall deposits". *Bulletin of Volcanology*, 51:1–15.
- [4] Fierstein, J.; Nathenson, M. 1992. "Another look at the calculation of fallout tephra volumes". *Bulletin of Volcanology*, 54:156–167.
- [5] Bonadonna, C.; Ernst, G.; Sparks, R. 1998. "Thickness variations and volume estimates of tephra fall deposits: the importance of particle Reynolds number". *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 81:173–187.
- [6] Bonadonna, C.; Houghton, B. 2005. "Total grain-size distribution and volume of tephra fall deposits". *Bulletin of Volcanology*, 67:441–456.
- [7] Biass, S.; Bonadonna, C. 2011. "A quantitative uncertainty assessment of eruptive parameters derived from tephra deposits: The example of two large eruptions of Cotopaxi volcano, Ecuador". *Bulletin of Volcanology*, 73:73–90.
- [8] Eychenne, J.; Le Pennec, J.; Troncoso, L.; Gouhier, M.; Nedelec, J. 2012. "Causes and consequences of bimodal grain-size distribution of tephra fall deposited during the August 2006 Tungurahua eruption (Ecuador)". *Bulletin of Volcanology*, 74:187–205.
- [9] Le Pennec, J.; Ruiz, G.; Ramón, P.; Palacios, E.; Mothes, P.; Yepes, H. 2012. "Impact of tephra falls on the Andean communities: The influences of eruption size and weather conditions during the 1999-2001 activity of Tungurahua volcano, Ecuador". *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 217:91–103.
- [10] Bustillos, J. 2010. "Transición del estilo eruptivo durante las erupciones andesíticas en sistema abierto: Contribución al estudio de los depósitos de ceniza del volcán Tungurahua". *Master thesis, Nice Sophia Antipolis University, France*, 48.
- [11] Bustillos, J.; Mothes, P. 2010. "Ash falls at Tungurahua volcano: implementation of systematic ash collection for quantifying accumulated volumes". *Cities On Volcanoes 6 abstract volume, Tenerife, Canary Island, Spain. May 31 - June 4 2010, 2.7-O-07*.
- [12] Bernard, B. 2013. "Homemade ashmeter: a low-cost, high-efficiency solution to improve tephra field-data collection for contemporary explosive eruptions". *Journal of Applied Volcanology*, 2:1–9.
- [13] Bonadonna, C.; Costa, A. 2012. "Estimating the volume of tephra deposits: A new simple strategy". *Geology*, 40 (5):415–418.
- [14] Bonadonna, C.; Costa, A. 2013. "Modeling of tephra sedimentation from volcanic plumes". in: *Modeling Volcanic Processes: The Physics and Mathematics of Volcanism*. CAMBRIDGE: Cambridge University Press, Editors: S.A. Fagents, T.K.P. Gregg, R.M.C. Lopes, in press, ISBN: 9780521895439.

Erratum: Presencia de *Brucella* sp. en cabras de la ciudad de Quito, provincia de Pichincha, Ecuador. Publicado en Avances, 2012, Vol. 4, No. 2, Pags. B9-B11

Carmen Zabala¹, Verónica Barragán¹ y Gabriel Trueba^{1*}

¹Universidad San Francisco de Quito USFQ, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales COCIBA, Instituto de Microbiología, calle Diego de Robles y Vía Interoceánica, Casilla Postal 17-1200-841, Quito, Ecuador

* Autor principal/Corresponding author, e-mail: gtrueba@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: Cesar Zambrano, Ph.D.

Recibido/Received: 12/05/2013. Aceptado/Accepted: 20/05/2013.

Publicado en línea/Published on Web: 28/06/2013. Impreso/Printed: 06/06/2013.

La Tabla 2 del artículo publicado en Avances, 2012, Vol. 4, No. 2, Pags. B9-B11 debe ser reemplazado por esta tabla.

Tipo de muestra	Método de detección	Muestras analizadas	Muestras positivas	Positividad
Ganglio	PCR	100	8	8 %
Leche cruda	PCR	100	9	9 %
Suero	Rosa de Bengala	101	18	17.8 %

Tabla 2: Muestras de ganglios, leche cruda y suero de cabras colectadas en la ciudad de Quito, Ecuador, analizadas para la presencia de *Brucella* sp. utilizando PCR y Rosa de Bengala.

First report of Porcine Circovirus 2 (PCV2) circulation in Ecuador

Estefanía Bermeo^{1,2}, Verónica Barragán^{1*}, Alejandro Torres², Alfredo Acosta³ y Gabriel Trueba¹

¹Universidad San Francisco de Quito USFQ, Instituto de Microbiología, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Campus Cumbayá, Casilla Postal 17-1200-841, Quito, Ecuador.

²Universidad San Francisco de Quito USFQ, Escuela de Medicina Veterinaria, Campus Cumbayá, Casilla Postal 17-1200-841, Quito, Ecuador.

³Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro

*Autor principal/Corresponding author, e-mail: vbarragan@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: Cesar Zambrano, Ph.D.

Recibido/Received: 11/05/2013. Aceptado/Accepted: 26/05/2013.

Publicado en línea/Published on Web: 28/06/2013. Impreso/Printed: 06/06/2013.

Abstract

This report describes the first detection of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) from pigs in Ecuador. Samples were collected from 162 animals from November 2010 to March 2011: 25 sick animals from commercial swine herds and 137 from slaughterhouses. To detect the virus we used polymerase chain reaction (PCR) and two primer set. Our procedure revealed PCV2 DNA in 24 of 25 clinically affected pigs from farms and 77 of 137 pigs from slaughterhouses. The nucleotide sequence analysis of nine amplicons confirmed the PCV2 detection with at least a 95% homology compared with other PCV2 found in the GenBank database. Additionally, microscopic lesions in tissues of clinically affected pigs suggested porcine circovirus infection.

Keywords. Porcine Circovirus Type 2, PCR, DNA, Ecuador

Resumen

Este reporte es la primera identificación de Circovirus porcino tipo 2 (PCV2) en cerdos del Ecuador. Desde noviembre 2010 a Marzo 2011 se colectaron muestras de 162 animales: 25 animales enfermos provenientes de granjas comerciales y 137 a partir de camales. Para detectar ADN de PCV2 utilizamos la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con dos pares de cebadores. Se detectó positividad en 24 de los 25 cerdos analizados a partir de granjas comerciales y en 77 de los 137 animales provenientes de camales. El análisis de secuencias de ADN obtenidas a partir de nueve amplicones confirmó la detección de PCV2 con al menos el 95% de homología en relación a otras secuencias de PCV2 encontradas en la base de datos del GenBank. Adicionalmente las lesiones microscópicas en los tejidos de cerdos clínicamente afectados, fueron compatibles con infección por circovirus porcino.

Palabras Clave. Circovirus porcino tipo 2, PCR, ADN, Ecuador

Porcine Circovirus 2 (PCV2) is the etiologic agent of porcine circovirus diseases (PCVD) (Allan et al. 2000) and has a worldwide distribution. PCV2 targets and replicates in lymphoid tissues causing lymphoid depletion, enlarged lymph nodes, and histiocytic replacement in lymphoid tissues. It affects young and mature pigs. In young pigs ages 5-12 weeks it causes progressive weight loss, respiratory signs, lymph node hypertrophy, diarrhea, and jaundice [1-3]. In mature animals PCV2 causes: dermatitis and nephropathy syndrome, enteritis, porcine respiratory disease complex, and reproductive disorders [4-6].

Virus transmission occurs both horizontally and vertically; PCV2 has been detected in nasal, rectal, urinary,

salivary, semen, ocular and tonsillar secretions, and transplacental transmission may cause reproductive disorders [2, 6-9]. Usually, dissemination of PCV2 in a herd is hard to control due to absence of signs, the variety of transmission routes, and long periods of viral shedding.

This work was performed in Ecuador, a South American country in which circovirus vaccine is not available because the lack of disease reports. We used two PCR complementary protocols (2 primer sets followed by nucleotide sequencing of amplicons) to detect PCV2 in Ecuadorian swine herds. From November 2010 to March 2011, 137 swine animals were sampled from slaughterhouses distributed along the Ecuadorian territory and 25 from industrial swine operations (5-26 week old with

ISSN 1390-5384



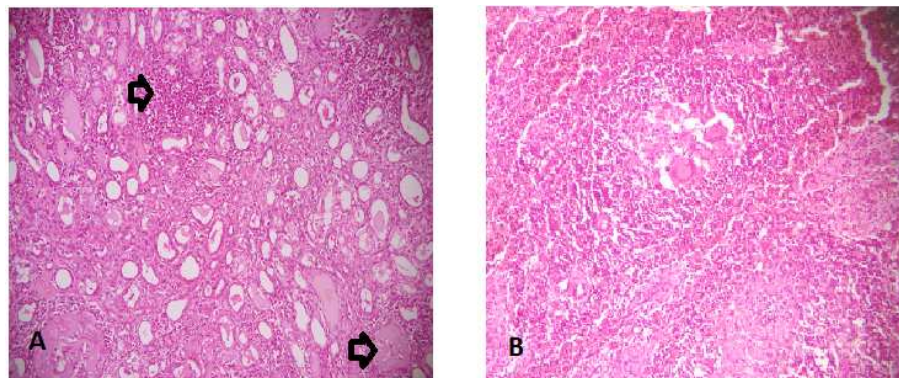


Figure 1: Histopathology of swine tissues infected with circovirus. (A) Kidney (100X) arrows show enlarged hyalinized glomeruli and interstitial lymphohistiocytic inflammatory infiltration with proteinaceous casts accumulation of inflammatory cells (B) Spleen (100X) showing lymphoid depletion with lymphohistiocytic and granulomatous inflammatory lesion.

apparently PCVD signs). Lung, lymph nodes, spleen, kidney and liver were collected from each animal.

Lung, lymph nodes, spleen, kidney and liver samples were pooled and homogenized and submitted to DNA extraction following a previously published protocol [10]. For PCR we used two different PCR protocols that amplify ORF2; which encodes for major structural capsid proteins. The first PCR protocol used primers 1443f-1150r and amplified a 481pb fragment of ORF2; the second PCR protocol used primers Fa2-Ra2 amplifying a 476pb fragment located at nucleotides 828 to 1584 and of a region of ORF1 and ORF2 [1, 11]. A sample was considered positive for PCV2 when an amplicon of the right size was observed when using one of the two primer sets. Nine amplicons were sent to Functional Biosciences Inc. (Madison, Wisconsin, USA) for nucleotide sequencing. Nucleotide sequences were analyzed with MEGA 5.0 (www.megasoftware.net) and compared to homologous sequences and vaccine sequences available in GenBank using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

The two PCR protocols used were complementary. From 101 positive samples 70 amplified with both sets of primers; 19 amplified only with primers Fa2-Ra2 and 12 samples amplified only with primers 1443-150. Our results showed positivity in 24 of 25 swines from commercial herds, and in 77 from 137 swine tissues collected at slaughter houses. Sequences analysis confirmed PCV2 detection with less than 95% homology compared with other GenBank PCV2 sequences.

Additionally tissues were fixed with 10% formaldehyde pH 7.2 and submerged in paraffin. Paraffin blocks were cut in sections of 2 μ m, stained with hematoxylin and eosin, and examined by microscopy at 100x. Histopathology was performed in kidney, spleen and liver samples collected from 25 animals (industrial swine operations). All animals had lesions suspicious of PCVD infection: regional or generalized lymphadenopathy, weight loss, dermatitis, and respiratory signs such as dyspnea.

This study reports for the first time the presence of Porcine PCV-2 in Ecuadorian swine herds. The results of the

PCR test indicated high infection rates (62%) which is in agreement with reports in other Latin-American countries such as Brazil (70%) and Colombia, (63-100%) [12, 13]. Nucleotide sequences from amplicons confirmed the circoviral DNA in all the amplicons analyzed (data not shown). All tissues from symptomatic animals showed suggestive histopathology: microscopic examination evidenced enlarged and hyalinized glomeruli and lymphohistiocytic multifocal infiltration in the renal interstice (Fig 1A), lymphoid depletion in the spleen (Fig 1B) and cholangio hepatitis (data not shown).

The PCR protocols used in this research provided the evidence needed by sanitary authorities to initiate a vaccination program in Ecuador. Vaccination against PCV2 is essential to control this viral infection and to prevent economic negative impact due to the absence of an effective treatment [14]. The use of commercial vaccines has proven to give significant protection, increasing average daily weight and diminishing mortality rates [14, 15].

Acknowledgments

This work was funded by ASPE (Asociación de Porcicultores del Ecuador). Authors would like to thank Ing. Orellana (ASPE), Dr. Javier Vargas (Agrocalidad), Dr. Ramiro Gonzales (Camal Metropolitano de Quito) and field technicians from Agrocalidad. We also like to thank the support of Instituto de Microbiología, Universidad San Francisco de Quito USFQ (Ecuador).

References

- [1] Ellis, J.; Bratanich, A.; Clark, E.; Allan, G.; Meehan, B.; Haines, D.; Harding, J.; West, K.; Krakowka, S.; Konoby, C.; Hassard, L.; Martin, K.; McNeilly, F. 2000. "Coinfection by Porcine Circoviruses and Porcine Parvovirus in Pigs with Naturally Acquired Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome". *J VET Diagn Invest*, 12:21 – 27.
- [2] Shibata, I.; Okuda, Y.; Yazawa, S.; Ono, M.; Sasaki, T.; Itagaki, M.; Nakajima, N.; Okabe, Y.; Hidejima, I. 2003. "PCR detection of Porcine circovirus type 2 DNA

- in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases". *J. Vet. Med. Sci.*, 65(3):405 – 408.
- [3] Yang, J.; Song, D.; Kim, S.; Lyoo, K.; Park, B. 2003. "Detection of Porcine Circovirus Type 2 in Feces of Pigs with or without Enteric Disease by Polymerase Chain Reaction". *J VET Diagn Invest*, 15(4):396 – 373.
- [4] Morin, M.; Girard, C.; ElAzhary, Y.; Fajardo, R.; Drolet, R.; Lagace, A. 1990. "Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: A newly recognized disease". *Can Vet J*, 31(12):837 – 839.
- [5] Jensen, T.; Vigre, H.; Svensmark, B.; Bille-Hansen, V. 2006. "Distinction between porcine circovirus type 2 enteritis and porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*". *J. Comp. Pathol*, 135(4):176 – 182.
- [6] West, K.; Bystrom, J.; Wojnarowicz, C.; Shantz, N.; Jacobson, M.; Allan, G.; Haines, D.; Clark, E.; Krakowka, S.; McNeilly, F.; Konoby, C.; Martin, K.; Ellis, J. 1990. "Myocarditis and Abortion Associated with Intrauterine Infection of Sows with Porcine Circovirus 2". *J VET Diagn Invest*, 11(6):530 – 532.
- [7] Bolin, S.; Stoffregen, W.; Nayar, G.; Hamel, A. 2001. "Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome Induced after Experimental Inoculation of Cesarean-Derived, Colostrum-Deprived Piglets with Type 2 Porcine Circovirus". *J VET Diagn Invest*, 13(3):185 – 194.
- [8] Krakowka, S.; Ellis, J.; Meehan, B.; Kennedy, S.; McNeilly, F.; Allan, G. 2000. "Viral Wasting Syndrome of Swine: Experimental Reproduction of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Gnotobiotic Swine by Coinfection with Porcine Circovirus 2 and Porcine Parvovirus". *Vet Pathol*, 37(3):254 – 263.
- [9] Larochelle, R.; Bielanski, A.; Müller, P.; Magar, R. 2000. "PCR Detection and Evidence of Shedding of Porcine Circovirus Type 2 in Boar Semen". *J. Clin. Microbiol*, 38(12):4629 – 4632.
- [10] Doyle, J. 1987. "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue". *Phytochem Bull*, 19:11 – 15.
- [11] de Castro, A.; Cortez, A.; Heinemann, M.; Brandão, P.; Richtzenhain, L. 2007. "Genetic diversity of Brazilian strains of porcine circovirus type 2 (PCV-2) revealed by analysis of the cap gene (ORF-2)". *Arch Virol*, 152(8): 1435 – 1445.
- [12] Pérez, L. 2010. "Detección de *Streptococcus suis* en lechones de distintas edades en explantaciones porcinas de tipo intensivo". *Pontificia Universidad Javeriana, Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas: Bogotá*.
- [13] Ciacci-Zanella, J.; Morés, N. 2003. "Diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus type 2". *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 55(5): 522 – 527.
- [14] Segalés, J.; Allan, G.; Domingo, M. 2005. "Porcine circovirus diseases". *Anim Health Res Rev*, 6(2):119 – 142.
- [15] Chae, C. 2005. "A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases". *Vet. J*, 169(3):326 – 336.

Detección de *Coxiella burnetii* en leche de bovinos domésticos del Ecuador

M. Isabel Rojas¹, Verónica Barragán^{1*}, Gabriel Trueba¹, Heidie Hornstra², Talima Pearson² y Paul Keim²

¹Universidad San Francisco de Quito USFQ, Instituto de Microbiología, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Campus Cumbayá, Casilla Postal 17-1200-841, Quito, Ecuador.

²Northern Arizona University, Center for Microbial Genetics and Genomics, 1298 South Knoles Drive, Flagstaff, Arizona, EE.UU.

*Autor principal/Corresponding author, e-mail: vbarragan@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: Diego Cisneros H., Ph.D.

Recibido/Received: 17/10/2012. Aceptado/Accepted: 09/05/2013.

Publicado en línea/Published on Web: 28/06/2013. Impreso/Printed: 06/06/2013.

Abstract

Ruminants are the main reservoir of *Coxiella burnetii*, an obligate intracellular Gram negative pathogen. This microorganism is the causative agent of Q fever, a zoonosis transmitted to humans by contacting contaminated fluids from infected animals, inhaled aerosols or consuming milk from infected animals. We used Real-Time PCR assay with a TaqMan fluorescent probe to detect the pathogen in samples of bovine milk collected from random locations in nine Ecuadorian provinces. The assay targeted a 61-63bp repetitive sequence within the IS1111 transposon in *C. burnetii*. The assay found positive samples in two provinces located close to the Colombian and Peruvian borders and in Chimborazo (Ecuadorian central region). This study is the first in Ecuador to detect *Coxiella burnetii* using a molecular method of high sensitivity.

Keywords. Q fever, *Coxiella burnetii*, Real-Time PCR

Resumen

Los rumiantes son el principal reservorio de *Coxiella burnetii*, un cocabacilo Gram negativo intracelular estricto. Este microorganismo es el causante de la Fiebre Q, una zoonosis transmitida hacia a los humanos a través del contacto con fluidos, inhalación de aerosoles o el consumo de leche proveniente de animales infectados. Utilizamos PCR en tiempo real con una sonda fluorescente TaqMan para la detección del patógeno en muestras de leche bovina colectadas en localidades aleatorias en nueve provincias de Ecuador. La detección se enfocó en una secuencia repetitiva de 61-63pb del transposón IS1111 de *C. burnetii*. El estudio encontró muestras positivas para *C. burnetii* tanto en la provincia de Chimborazo en el Ecuador, como en zonas de frontera con Colombia y Perú. Este estudio es el primero en Ecuador que detecta al patógeno *Coxiella burnetii* a través de un método molecular de alta sensibilidad.

Palabras Clave. Fiebre Q, *Coxiella burnetii*, PCR en tiempo real

Introducción

La Fiebre Q es una zoonosis de distribución mundial caracterizada por primera vez en 1935 en Australia en pacientes con fiebre de origen desconocido [1, 2]. Su transmisión se da por medio del consumo de leche no pasteurizada y por la inhalación de orina, heces o líquido amniótico secos presentes en los lugares de ordeño, faena o residencia de los animales [3–5]. Los reservorios del agente causal de la Fiebre Q son animales del suborden Ruminantia, aunque ha sido reportada en aves, perros, gatos y garrapatas [6–9].

El agente causal de la Fiebre Q es *Coxiella burnetii*, una bacteria intracelular que se multiplica dentro de una es-

tructura similar al fagolisosoma [10] y posee mecanismos de adhesión e invasión a las células del hospedador y de evasión del sistema inmune del hospedador [6, 10, 11]. Luego de su replicación, las células bacterianas de *C. burnetii* maduran y son liberadas por el hospedador en forma de esporas, pudiendo sobrevivir a condiciones ambientales por períodos prolongados [6]. La resistencia a altas temperaturas, sustancias desinfectantes y valores reducidos de disponibilidad de agua, permiten a *C. burnetii* persistir en el ambiente por períodos prolongados de tiempo y por lo tanto constituye un microorganismo relacionado directamente con la seguridad alimentaria [3, 10].

Las manifestaciones clínicas de la Fiebre Q se asemejan

ISSN 1390-5384



a aquellas de fiebres tífus sin eruptiva, con síntomas inespecíficos como fiebre y jaqueca, lo que ha conducido a su subdiagnóstico [12, 13]. Afecta principalmente a las vías respiratorias, aproximadamente un 50 % de los casos son asintomáticos y generan inmunidad a largo plazo [12, 14]. El cuadro agudo se manifiesta entre la primera y tercera semana post exposición, se asemeja a una gripe febril y presenta comúnmente neumonía atípica con cefalea y la elevación de enzimas hepáticas [13, 15]. Puede causar hepatitis granulomatosa y miocarditis, también se ha reportado abortos y partos prematuros en mujeres [13, 16]. Las manifestaciones de fatiga crónica posterior al cuadro agudo han sido registradas en un 10 % de los casos [17]. El cuadro crónico parece estar asociado a pacientes inmunodeprimidos por una activación deficiente de los macrófagos que resulta en hepatitis crónica, osteoartritis, afecciones cerebro vasculares y endocarditis [18–22]. *Coxiella burnetii* también es de importancia en la industria ganadera debido a que produce raquitismo, partos prematuros y abortos ocasionales en el ganado ovino, caprino y bovino [23].

La infección por *Coxiella burnetii* ha sido reportada en países de América Latina como Brasil, Perú, Colombia y Venezuela, mediante métodos serológicos [24–27]. Un único estudio ha sido realizado en el Ecuador, se llevó a cabo pacientes febriles en la Amazonía ecuatoriana, en la provincia de Pastaza, durante los años 2001 - 2004 y evidenció el 4,9 % de seropositividad contra *C. burnetii* en pacientes febriles, lo que sugiere la presencia de este patógeno en el país [28]. Sin embargo debido a que no se ha reportado esta enfermedad en otras zonas del país y a que los análisis serológicos están sujetos a reacción cruzada con otros patógenos y por ende a la presencia de falsos positivos, se desconoce la situación real de la fiebre Q en el Ecuador. No se cuenta con registros de la presencia de *C. burnetii* en animales domésticos.

El objetivo del presente estudio fue establecer la presencia de *Coxiella burnetii* en muestras de leche de bovinos de distintas localidades del Ecuador. Para esto se analizó la presencia de este patógeno mediante la detección de una secuencia única en *C. burnetii* dentro de la secuencia repetitiva del transposón IS1111, mediante la técnica TaqMan de PCR en tiempo real.

Métodos

Para este estudio se colectó un total de 110 muestras de leche de bovino, de las cuales 102 fueron colectadas en nueve provincias del Ecuador y 8 en tres países de la región (Tabla 1). Las muestras colectadas en Ecuador fueron obtenidas a partir de tanques de enfriamiento en lugares de acopio, los mismos que constituyen colecciones de leche provenientes de varias granjas colindantes. La raza del bovino, el tamaño de la granja y el nivel de tecnificación de su método de ordeño no se consideraron factores discriminatorios. Las muestras fueron almacenadas a -20°C y procesadas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito USFQ (Quito, Ecuador).

Para la extracción de ADN se tomó 500 µL de cada muestra y se adicionó 20 µL de proteinasa K para luego incubar a 56°C por una hora. Luego se centrifugó la muestra a 11,219xg por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se retiró la grasa restante con un hisopo estéril. Se adicionó 500 µL de una solución de Chelex® 100 (BioRad) al 5 % y se dejó incubar a 95°C por 20 minutos. Se centrifugó las muestras a 15,584xg por 7 minutos y se recuperó el sobrenadante [29]. Todas las muestras fueron cuantificadas en un Nanodrop y corridas en un gel de agarosa 1 % con un SimplyLoad® DNA QuantLadder (LONZA). Ninguna muestra dio bandas ni lecturas, por lo que se cree que las concentraciones de ADN se encontraron fuera de los rangos de sensibilidad de los métodos usados. Para descartar la presencia de compuestos inhibidores de la PCR, se corrieron ensayos de amplificación de una región del 16S del ARN ribosomal bacteriano con los cebadores 16S-F (5'-CIC CTA CGG GIG GCW GCA C-3') y 16S-R (5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT-3') (Integrated DNA Technologies). El tamaño del producto esperado fue de 470pb. La amplificación se llevó a cabo en un aparato Roche LightCycler® 1.5, se utilizó el kit de Roche LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I, con su correspondiente protocolo para la preparación de las reacciones. El perfil térmico utilizado fue 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, y 50 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, seguido de una fase de disociación (95°C por 15 segundos, 55°C por 15 segundos, 95°C por 15 segundos). La amplificación de una región del transposón IS1111 se llevó a cabo mediante el protocolo de Loftis et al, 2006, usando los primers IS1111-F (5'-CCGATCATTGGGCGCT-3') y IS1111-R (5'-CGGCGGTGTTAGGC-3'), con la sonda IS1111P (5'-TTAACACGCCAAGAAACGTATCGCTGTG-3') marcada con el fluoróforo 6-FAM y el quencher BHQ [8]. La amplificación se llevó a cabo en un equipo BioRad CFX96TM Real-Time PCR Detection System con el kit de Applied Biosystems (ABI) TaqMan Universal PCR Master Mix. Se utilizó el siguiente perfil térmico: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, y 50 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minutos. El tamaño del producto esperado fue de 61 a 63pb y los valores óptimos de Ct oscilaron entre 32,3 y 37,0 (valores previamente determinados en el Laboratorio del Centro de Genética Microbiana y Genómica (MGGen) de University of North Arizona (NAU), EE.UU). Como control positivo se empleó una de las muestras del estudio (55) que presentó curvas consistentes en dos laboratorios (MGGen-NAU y USFQ). Debido a que la metodología utilizada no había sido probada en el Ecuador se envió, a manera de control externo, un grupo de muestras seleccionadas aleatoriamente para ser analizadas en el Laboratorio MGGen de NAU, evidenciándose similitud en los valores de Ct obtenidos en las muestras positivas en los dos laboratorios.

País	Provincia	Tratamiento	Número de muestras	Código de muestras
Ecuador	Pichincha	Cruda	26	1, 2, 37-51, 80-84, 90-93
Ecuador	Cotopaxi	Cruda	12	2-14
Ecuador	Carchi	Cruda	26	15-32, 75-79, 94-96
Ecuador	Loja	Cruda	4	33-36
Ecuador	Chimborazo	Cruda	5	52-56
Ecuador	Pastaza	Cruda	13	57-69
Ecuador	Guayas	Cruda	5	70-74
Ecuador	Galápagos	Cruda	5	85-89
Ecuador	Imabura	Cruda	6	97-102
Perú	n/a	Ultrapasteurizada, UHT	3	401-403
Argentina	n/a	Pasteurizada	1	404
Colombia	n/a	UHT, Crema Cruda	4	405-408

Tabla 1: Muestras colectadas en distintas regiones del Ecuador y fuera del territorio ecuatoriano.

Resultados

De las 102 muestras analizadas de Ecuador, tres de la región de Chambo (provincia de Chimborazo) resultaron positivas (Muestra 53, Ct: 36.62; Muestra 54, Ct: 32.73; Muestra 55, Ct: 37.10) para la amplificación de la región repetitiva del transposón IS1111. Las muestras colectadas en granjas de localidades aledañas no presentaron resultados similares, de manera que no se evidenció un patrón de distribución en las regiones de las que provinieron las muestras, lo que puede atribuirse al confinamiento del ganado, el cual minimiza el contacto entre individuos.

En las muestras de los otros países sudamericanos, dos de las tres muestras de leche tratada del Perú (Muestras 402A y 403A) resultaron positivas con un Ct de 36.16 y 36.10, respectivamente. Una de las cuatro muestras de Colombia (Muestra 407) fue positiva con un Ct de 37.32. Algunas de las muestras positivas habían recibido tratamientos térmicos (pasteurización, ultrapasteurización, UHT), lo que comprueba la presencia de *C. burnetii* en el ganado más no evidencia su viabilidad. Estos resultados corroboran la presencia de la bacteria en los países vecinos con los que el Ecuador mantiene fronteras abiertas [25, 26].

Conclusiones

El presente estudio constituye el primer reporte de detección de *Coxiella burnetii* en leche de bovino de granjas ecuatorianas. Estudios anteriores únicamente sugieren la presencia de fiebre Q mediante la detección de anticuerpos contra *C. burnetii* en pacientes febriles mas no a través de un método molecular [28]. La técnica utilizada para detectar el material genético de la bacteria posee una alta sensibilidad y especificidad en comparación con el PCR convencional y otras técnicas moleculares [30]. La región blanco del transposón IS1111 a la que se ha ligado la sonda está presente de 10 a 100 secuencias en cada genoma bacteriano, lo que permite detectar pequeñas cantidades de DNA de *C. burnetii* en una variedad de muestras de tejidos y fluidos de animales incluyendo humanos [8, 31]. Adicionalmente, la prueba de amplificación para el ADNr 16S descarta la

presencia de falsos negativos en aquellas muestras no reactivas para el ensayo de detección de *C. burnetii* (TaqMan IS1111).

En el Ecuador existe limitada información acerca de la fiebre Q en humanos, según la literatura, un alto porcentaje de los individuos infectados no presenta sintomatología o bien evidencia sintomatología inespecífica, lo que dificulta su detección. En otros países como Brasil, Venezuela, Perú y Colombia, los estudios de identificación de *C. burnetii* se han centrado en ensayos serológicos [24–27]. Al momento, Estados Unidos, Holanda y el Ecuador, son de los pocos países del mundo que han usado la tecnología del PCR en tiempo real TaqMan para la detección de *C. burnetii* [8, 23, 30]. Los resultados de este estudio constituyen un punto de partida para futuras investigaciones acerca de la prevalencia, la transmisión, el control de fiebre Q en humanos y la implementación de sistemas de vigilancia de *C. burnetii* en animales.

Agradecimientos

Este estudio fue posible gracias a los ganaderos que colaboraron con la colecta y transporte de las muestras. Agradecemos a la Dra. Alexandra Narváez y al Blgo. Esteban Orellana del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por el préstamo del equipo de qPCR. Al Centro de Genética Microbiana y Genómica (MGGen) de University of North Arizona NAU (USA), por habernos provisto de los reactivos necesarios para la realización de este trabajo. Este trabajo fue apoyado por la Universidad San Francisco de Quito USFQ (Ecuador), a través del Instituto de Microbiología.

Referencias

- [1] Kaplan, M.; Bertagna, P. 1955. "The Geographical Distribution of Q Fever". *Bull World Health Organ*, 13(5): 829 – 860.
- [2] Derrick, E. 1937. "Q fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation". *Med J Australia*, 2:281 – 299.

- [3] Kim, S.; Kim, E.; Lafferty, C.; Dubovi, E. 2005. "Coxiella burnetii in Bulk Tank Milk Samples, United States". *Emerging Infectious Diseases*, 11(4):619 – 621.
- [4] Loftis, A.; Priestley, R.; Massung, R. 2010. "Detection of *Coxiella burnetii* in Commercially Available Raw Milk from the United States". *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(12):1553 – 1556.
- [5] Fishbein, D.; Raoult, D. 1992. "A cluster of *Coxiella burnetii* infections associated with exposure to vaccinated goats and their unpasteurized dairy products". *Am J Trop Med Hyg*, 47:35 – 40.
- [6] Maurin, M.; Raoult, D. 1999. "Q Fever". *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4):518 – 553.
- [7] Pinsky, R.; Fishbein, D.; Green, C.; Gensheimer, K. 1991. "An Outbreak of Cat-Associated Q Fever in the United States". *The Journal of Infectious Disease*, 164(1):202 – 204.
- [8] Loftis, A.; Reeves, W.; Szumlas, D.; Abbassy, M.; Helmy, I.; Moriarity, J.; Dasch, G. 2006. "Rickettsial agents in Egyptian ticks collected from domestic animals". *Exp Appl Acarol*, 40:67 – 81.
- [9] Reeves, W.; Loftis, A.; Sanders, F.; Spinks, M.; Wills, W.; Denison, A.; Dasch, G. 2006. "*Borrelia*, *Coxiella*, and *Rickettsia* in *Carios capensis* (Acari: Argasidae) from a brown pelican (*Pelecanus occidentalis*) rookery in South Carolina, USA". *Experimental and Applied Acarology*, 39:321 – 329.
- [10] Seshadri, R.; Paulsen, I.; Eisen, J.; Read, T.; Nelson, K.; Nelson, W.; Ward, N.; Tettelin, H.; Davidsen, T.; Beanan, M.; Deboy, R.; Daugherty, S.; Brinkac, L.; Madupu, R.; Dodson, R.; Khouri, H.; Lee, K.; Carty, H.; Scanlan, D.; Heinzens, R.; Thompson, H.; Samuel, J.; Fraser, C.; Heidelberg, J. 2003. "Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*". *PNAS*, 100(9):5455 – 5460.
- [11] Voth, D.; Howe, D.; Beare, P.; Vogel, J.; Unsworth, N.; Samuel, J.; Heinzen, R. 2009. "The *Coxiella burnetii* Ankyrin Repeat Domain-Containing Protein Family Is Heterogeneous, with C-Terminal Truncations that Influence Dot/Icm-Mediated Secretion". *Journal of Bacteriology*, 191(13):4232 – 4242.
- [12] Baca, O.; Paretsky, D. 1983. "Q Fever and *Coxiella burnetii*: a Model for Host-Parasite Interactions". *Microbiological Reviews*, 47(2):127 – 149.
- [13] Fournier, P.; Etienne, J.; Harle, J.; Habib, G.; Raoult, D. 2001. "Myocarditis, a Rare but Severe Manifestation of Q Fever: Report of 8 Cases and Review of the Literature". *Clinical Infectious Disease*, 32:1440 – 1447.
- [14] Tissot-Dupont, H.; Raoult, D. 2008. "Q fever". *Infect. Dis. Clin. N. Am.*, 22:505 – 514.
- [15] McQuiston, J.; Holman, R.; McCall, C.; Childs, J.; Swerdlow, D.; Thompson, H. 2006. "National Surveillance and the Epidemiology of Human Q Fever in the United States". *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 75(1):36 – 40.
- [16] Raoult, D.; Stein, A. 2004. "Q Fever during Pregnancy - A Risk for Women, Fetuses, and Obstetricians". *The New England Journal of Medicine*, 330(5):371.
- [17] Marmion, B.; Storm, P.; Ayres, J.; Semendric, L.; Mathews, L.; Winslow, W. 2005. "Long-term persistence of *Coxiella burnetii* after acute primary Q fever". *QJM*, 98: 7 – 20.
- [18] Meghari, S.; Bechah, Y.; Capo, C.; Lepidi, H.; Raoult, D.; Murray, P.; Mege, J. 2008. "Persistent *Coxiella burnetii* Infection in Mice Overexpressing IL-10: An Efficient Model for Chronic Q Fever Pathogenesis". *PLoS Pathog*, 4(2):e23.
- [19] Andoh, M.; Naganawa, T.; Hotta, A.; Yamaguchi, T.; Fukushi, H.; Masegi, T.; Hirai, K. 2003. "SCID Mouse Model for Lethal Q Fever". *Infection and Immunity*, 71(8):4717 – 4723.
- [20] Russell-Lodrigue, K.; Andoh, M.; Poels, M.; Shive, H.; Weeks, B.; Zhang, G.; Tersteeg, C.; Masegi, T.; Hotta, A.; Yamaguchi, T.; Fukushi, H.; Hirai, K.; McMurray, D.; Samuel, J. 2009. "*Coxiella burnetii* Isolates Cause Genogroup-Specific Virulence in Mouse and Guinea Pig Models of Acute Q Fever". *Infection and Immunity*, 77(12):5640 – 5650.
- [21] Fournier, P.; Marrie, T.; Raoult, D. 1998. "MINIREVIEW Diagnosis of Q Fever". *Journal of Clinical Microbiology*, 36(7):1823 – 1834.
- [22] Fenollar, F.; Fournier, P.; Carrieri, M.; Habib, G.; Messana, T.; Raoult, D. 2001. "Risks Factors and Prevention of Q Fever Endocarditis". *Clinical Infectious Diseases*, 33:312 – 316.
- [23] Hendrik, I.; Ruuls, R.; Tilburg, J.; Nabuurs-Franssen, M.; Klaassen, C.; Vellema, P.; van den Brom, R.; Dercksen, D.; Wouda, W.; Spierenburg, M.; van der Spek, A.; Buijs, R.; de Boer, A.; Willemsen, P.; van Zijderveld, F. 2011. "Molecular Epidemiology of *Coxiella burnetii* from Ruminants in Q Fever Outbreak, the Netherlands". *Emerging Infectious Diseases*, 17(4):668 – 675.
- [24] Gonçalves de la Costa, P.; Brigatte, M.; Greco, D. 2005. "Antibodies to *rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100(8): 853 – 859.
- [25] Blair, P.; Schoeler, G.; Moron, C.; Anaya, E.; Caceda, R.; Cespedes, M.; Cruz, C.; Felices, V.; Guevara, C.; Huaman, A.; Lockett, R.; Mendoza, L.; Richards, A.; Rios, Z.; Sumner, J.; Villaseca, P.; Olson, J. 2004. "Evidence of Rickettsial and Leptospira Infections in Andean Northern Peru". *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 70(4):357 – 363.
- [26] Parra, M.; Mattar, S. 2006. "Detection of Antibodies anti *Anaplasma*, *Bartonella* and *Coxiella*, in rural Inhabitants of the Caribbean area of Colombia". *Rev. MVZ Córdoba*, 11(2):781 – 789.
- [27] Orpeza, M.; Dickenson, L.; Maldonado, J.; Kowalski, A. 2010. "Seropositividad a *Coxiella burnetii* en cabras de la parroquia Trinidad Samuel del municipio Torres, estado Lara, Venezuela". *Zootecnia Trop*, 28(4):557 – 560.

- [28] Manock, S.; Jacobsen, K.; de Bravo, N.; Russell, K.; Negrete, M.; Olson, J.; Sanchez, J.; Blair, P.; Smalligan, R.; Quist, B.; Espín, J.; Espinoza, W.; MacCormick, F.; Fleming, L.; Kochel, T. 2009. "Etiology of Acute Undifferentiated Febrile Illness in the Amazon Basin of Ecuador". *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 81(1):146 – 151.
- [29] Walsh, P.; Metzger, D.; Higuchi, R. 1991. "Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material". *Bio Techniques*, 10(4):506 – 513.
- [30] Silke, K.; Ellenbrok, H.; Tyczka, J.; Franz, T.; Appel, B. 2006. "Evaluation of Real-Time PCR Assay to Detect *Coxiella burnetii*". *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 1078:563 – 565.
- [31] Huijsmans, C.; Schellekens, J.; Wever, P.; Toman, R.; Savelkoul, P.; Janse, I.; Hermans, M. 2011. "Single-Nucleotide-Polymorphism Genotyping of *Coxiella burnetii* during a Q Fever Outbreak in The Netherlands". *Applied and Environmental Microbiology*, 77(6):2051 – 2057.

Difficulties in the differential diagnosis of dengue and leptospirosis in Guayaquil

Andrés Abril Gamboa¹, Luis Vasco¹, Mauricio Espinel¹, Josefina Coloma² and Gabriel Trueba^{1*}

¹Universidad San Francisco de Quito, Instituto de Microbiología, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Calle Diego de Robles y Vía Interoceánica, Campus Cumbayá, Edif. Darwin. Casilla Postal 17-1200-841, Quito, Ecuador.

²University of California, Berkeley, Department Public Health-Infectious Diseases, 50 University Hall, Berkeley, California, USA.

*Autor principal/Corresponding author, e-mail: gtrueba@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: Cesar Zambrano, Ph.D.

Recibido/Received: 15/04/2013. Aceptado/Accepted: 20/05/2013.

Publicado en línea/Published on Web: 28/06/2013. Impreso/Printed: 06/06/2013.

Abstract

Leptospirosis and dengue fever are infectious diseases that co-occur during rainy seasons and both produce similar clinical signs. The purpose of this study was to assess the relative frequency of leptospirosis and dengue fever during a rainy season and the clinical difficulty to distinguish them. Blood samples from febrile patients in Guayaquil were obtained during the rainy season of 2008 and were analyzed by IgM ELISA for both diseases. Additionally, retrospective data (2003-2007) from febrile patients who attended one of largest public hospitals in Guayaquil were obtained. From 135 febrile patients samples, 15 (11.1%) were positive to leptospirosis; 36 (26.7%) to dengue fever; 3 (2.2%) to both pathogens and 81 (60%) were negative for both. Based on clinical diagnosis, cases were classified 68.1% as dengue fever; 20.7% as leptospirosis; 9.6% as malaria and 1.5% as other. However, 60% of patients clinically diagnosed as dengue had only antibodies against *Leptospira* and 25% patients diagnosed as leptospirosis had antibodies to dengue virus. The hospital archives indicated that 72.8% of patients clinically diagnosed as dengue fever had antibodies to *Leptospira* and not to dengue virus. The results suggest the two diseases are often misidentified which is a serious problem because both diseases require different medical treatment.

Keywords. 5-6 Leptospirosis, Dengue, ELISA, MAT

Resumen

La leptospirosis y dengue son enfermedades que presentan una sintomatología muy similar y ocurren durante las épocas lluviosas. El propósito del presente trabajo fue investigar la frecuencia de leptospirosis en la población de los barrios marginales de Guayaquil y el grado de dificultad que existe para distinguir clínicamente leptospirosis de dengue. Muestras de sangre de pacientes febriles provenientes de los barrios pobres de Guayaquil fueron colectadas durante la estación lluviosa del año 2008. Las muestras se sometieron a análisis de ELISA IgM para dengue y leptospirosis. Adicionalmente se obtuvieron datos retrospectivos (2003-2007) de historias clínicas de pacientes que acudieron a uno de los hospitales públicos más grandes de Guayaquil. De un total de 135 pacientes febriles, 15 (11.1%) fueron positivos a leptospirosis por ELISA, 36 (26.7%) fueron positivos a dengue, 3 (2.2%) fueron positivos a ambos patógenos y 81 (60%) fueron negativos para los dos. Sin embargo, 60% de los pacientes diagnosticados clínicamente como dengue tuvieron anticuerpos contra *Leptospira* y no para dengue y 25% pacientes diagnosticados como leptospirosis tuvieron anticuerpos contra el virus de dengue y no para *Leptospira*. Adicionalmente, los archivos hospitalarios (2003-2007) indicaron que 72.8% de los pacientes diagnosticados clínicamente como dengue tuvieron anticuerpos contra *Leptospira* y carecían de anticuerpos contra virus de dengue. Los resultados sugieren que ambas enfermedades son frecuentemente identificadas erróneamente lo que representa un problema grave de salud pública pues ambas enfermedades requieren un tratamiento médico completamente distinto.

Palabras Clave. 5-6 Leptospirosis, Dengue, ELISA, MAT

Introduction

Leptospirosis, a zoonosis that occurs throughout the world, especially in tropical climates [1-4] is caused by any

of the eleven pathogenic species of the spirochete *Leptospira* [5] and produces symptoms ranging from flu-like to life threatening hemorrhagic syndromes [6, 7].

ISSN 1390-5384



Although leptospirosis is classically associated to individuals working in close proximity to domestic and wild animals [8, 9] recent reports show increasing numbers of cases in people exposed to fresh water in urban settings or during recreational activities associated with fresh water [2, 4, 10–12]. In developing countries the disease causes a significant health burden in low-income and rural populations during rainy seasons [2, 6, 12, 13]. Urine from animal reservoirs (dogs, rats, pigs, cattle and wild mammals) contaminates rivers and puddles where humans and other animals get infected through water contact with lacerated skin or mucosa [4, 7]. People inhabiting low income communities are especially vulnerable to this infection due to deficient sewage systems, poor drainage, and large number of animal carriers [2, 6, 12–14].

Dengue viruses are transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes*, which are widespread in tropical and subtropical climates [15–17]. There are four distinct serotypes of dengue arbovirus: DENV1, DENV2, DENV3, DENV4 [15, 16]. The incidence of this illness tends to increase during rainy seasons due to the presence of water collections which favor the multiplication of mosquitoes [18, 19]. Similar to leptospirosis, dengue viruses can cause symptoms ranging from the classical self-limiting flu-like disease to a severe, potentially fatal hemorrhagic syndrome known as dengue shock syndrome [17–19]. Dengue is also an emerging disease because of the recent geographic expansion of the vector especially in Western Pacific Regions [16]. Multiple factors have contributed to the recent dissemination of the disease including rapid deficient drainage, population mobility, poor vector control, and more intense El Niño phenomena [16, 20, 21].

Leptospirosis and dengue fever are two diseases that co-occur in rainy seasons in tropical cities and share many symptomatic features and leptospirosis cases are often misdiagnosed as dengue [22–24]. The purpose of this study was to assess the burden of leptospirosis in the slums of Guayaquil and its possible confusion with dengue. Anti-leptospiral and anti-dengue virus IgM antibodies were investigated in blood from febrile patients inhabiting a slum of Guayaquil during rainy season 2008. Additionally we did a retrospective review of the clinical archives of the main infectious diseases public hospital of Guayaquil concerning these two infectious diseases.

Materials and Methods

Febrile patients

This project was approved by the bioethics committee of Universidad San Francisco de Quito. Febrile patients, residing at the Bastión Popular and Pascuales areas of Guayaquil, were detected by the health brigades of the Ecuadorian Ministry of Health and asked to fill out an informed consent and to donate a drop of blood during

rainy season of 2008. Additionally, patients were asked to fill out a survey form in order to identify risk factors associated to leptospirosis and Epi Info 3.4 package was used to calculate the Odds Ratio. Sample exclusion criteria were patients showing diarrheic symptoms, common cold symptoms, and patients younger than 4 years of age. Blood drops [25] were allowed to dry for at least 4 hours, wrapped with waxed paper and stored with silica gel for up to two weeks at room temperature and then stored at -20°C until processing [26, 27].

Serological tests

This procedure was previously utilized for HIV [28] and Dengue [27] surveillance. A 6 mm punch of the blood spot in filter paper was eluted in 150 µl of PBS and 29 µl of the eluted serum was placed in a well containing 71 µl of serum diluent reagent [26]. ELISA kits used for both leptospirosis and dengue were PanBio Pty. Ltd, Australia. Plates were covered and incubated at 37°C for 30 minutes, then washed with wash buffer 6 times, and allowed to dry. Instructions provided by the manufacturer were followed thereafter.

A microagglutination test [29] was performed in leptospiral ELISA positive sera and we used sera elution-correction previously described in order to obtain 1:100 sera dilution.

Retrospective hospital data

Partial data from leptospirosis suspected patients attending to Hospital de Infectología José Daniel Rodríguez Maridueña de Guayaquil during the last 5 years (2003–2008) was obtained and analyzed based on interview field form.

Results

A total of 135 specimens were obtained from febrile patients attending local health centers at Bastión popular and Pascuales, 15 (11.1%) were positive to *Leptospira* and 36 (26.7%) were positive for dengue, 3 (2.2%) were positive for both antigens and 81 (60%) were negative to both by IgM ELISA. Dengue fever was clinically diagnosed in 68.1% of the febrile patients, leptospirosis in 20.7%, malaria 9.6%, and other 1.5% (Table 1). Clinical diagnosis of these patients showed little correspondence to their serologic reactivity; 9 patients (60%) clinically diagnosed as dengue cases showed positive IgM titers to *Leptospira* and no reactivity to dengue. Conversely 25% of patients clinically diagnosed as leptospirosis cases had positive IgM titers to dengue virus and did not show any reactivity to leptospiral test. *Leptospira* ELISA positive sera showed highest MAT titers to serovar Patoc in 7 sera, serovar Panama in 3 sera, serovar Pomona in 3 sera, serovar Icterohaemorrhagiae in 2 sera, serovar Tarassovi in 2 sera and serovar Autumnalis in 1 serum.

Archival clinical data from the hospital corresponding to the period 2003 to 2007 showed that the number of

Clinical Diagnosis	Number of ELISA Positive Sera			
	Dengue	Leptospirosis	Both	None
Leptospirosis	9	4	1	14
Dengue Fever	23	9	2	58
Malaria	4	2	0	7
Other	0	0	0	2
Total	36	15	3	81

Table 1: Clinical diagnosis compared to serologic results. Numbers correspond to febrile patients from slums in Guayaquil (2008) diagnosed clinically and by ELISA.

suspected dengue cases was 59 and the number of suspected leptospirosis cases was 29. Inconsistencies between clinical diagnosis and laboratory results were also evident in these records; 72.88% of patients clinically diagnosed as dengue showed positive serology to *Leptospira* and no reactivity to dengue virus and 17.2% of patients clinically diagnosed as leptospirosis had positive serology to dengue virus and no reactivity to *Leptospira*, 25.4% of patients clinically diagnosed as dengue had positive sera for both, *Leptospira* and dengue virus, 1 case reported as dengue fever, and 5 reported as leptospirosis were negative for both ELISA tests (Table 2).

Symptoms associated to leptospirosis ELISA positive and dengue ELISA positive sera were very similar (data not shown) and the main risk factors associated (OR > 2.0) to sera positive to leptospirosis were: contact with contaminated drain water at home, flooding water near to home and evidence of rats at home or at work. Risk factor associated to sera positive to dengue ELISA were garbage close to home, proximity to drain water and evidence of rats at home.

Conclusions

The data presented here suggests that dengue and leptospirosis are two very common infectious diseases that co-occur during rainy seasons in poor communities in Guayaquil. Dengue reactivity was more frequent than leptospirosis in sera from febrile patients during the rainy season of 2008. The results also suggested that 68.5% of the febrile cases (classified as dengue or leptospirosis) were misdiagnosed and the discrepancy between the clinical diagnosis and the serology may reflect the similarity of the clinical manifestations of these two diseases. Misdiagnosis of these two diseases is an important public health concern because both diseases require different therapeutic approaches. Clinical complications of leptospirosis can be easily avoided by using antibiotics [6, 9, 30].

Dengue fever and leptospirosis also share some risk factors associated to low income and rapidly growing communities in tropical cities during rainy seasons (accumulation of water and deficient drainage). It is important to take into account that some of these conditions may worsen by global warming [14, 15, 20].

In rainy season of 2008 we found more febrile patients with evidence of dengue than patients with evidence of leptospirosis, however these proportions may vary in different locations and different years; a recent report

Clinical Diagnosis	Number of ELISA Positive Sera				Total
	Dengue	Leptospirosis	Both	None	
Dengue Fever	–	43	15	1	59
Leptospirosis	5	4	15	5	29
Total	5	47	30	6	88

Table 2: Clinical diagnosis compared to serologic results in archival clinical data from leptospirosis suspected patients attending Hospital de Infectología José Daniel Rodríguez Maridueña (Guayaquil) 2003-2008

showed that leptospirosis is the most frequent infection in febrile patients inhabiting towns in the Ecuadorian Amazon region [31] and in the rainy season 1997-1998 a leptospirosis outbreak in Guayaquil produced 11.8% mortality and high hospitalization rates [32].

Acknowledgements

This research was funded by the Sustainable Research Institute. We would like to thank Albert Ko for his technical advice, Jessica Prince for her valuable assistance, Veronica Barragán and Sonia Zapata for their helpful input, Dr. Limones for allow us to access to medical records. To Dr. Ximena Durán, Dr Leibert Chancay, Dr. Elio Castro, María Elena Veloz, Dr. Max Torres, Dr. Julian Varas, Dr. Hugo Duarte, Dr. Eloy Mite, Dr. Christian Castro and Mrs. Amanda Abad from Bastión Popular medical centers for their help in collecting samples and filling the forms of patients.

References

- [1] Ellis, T.; Imrie, A.; Katz, A.; Effler, P. 2008. "Under-recognition of leptospirosis during a dengue fever outbreak in Hawaii". *Vector Borne Zoonotic Dis*, 8:541 – 547.
- [2] Ko, A.; Galvão, M.; Ribeiro, C.; Johnson, W.; Riley, L. 1999. "Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil, Salvador leptospirosis study Group". *Lancet*, 354:820 – 825.
- [3] Levett, P.; Branch, S.; Edwards, C. 2000. "Detection of dengue infection in patients investigated for leptospirosis in Barbados". *Am J Trop Med Hyg*, 62:112 – 114.
- [4] McBride, A.; Athanazio, D.; Reis, M.; Ko, A. 2005. "Leptospirosis". *Curr Opin Infect Dis*, 18:376 – 386.
- [5] Xue, F.; Yan, J.; Picardeau, M. 2009. "Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes". *Microbes Infect*, 11:328 – 333.
- [6] Levett, P. 2001. "Leptospirosis". *Clin. Microbiol Rev*, 14:296 – 326.
- [7] Vinetz, J. 2001. "Leptospirosis". *Curr Opin Infect Dis*, 14:527 – 538.
- [8] Benschop, J.; Heuer, C.; Jaros, P.; Collins-Emerson, J.; Midwinter, A.; Wilson, P. 2009. "Sero-prevalence of leptospirosis in workers at a New Zealand slaughterhouse". *N Z Med J*, 122:39 – 47.
- [9] Faine, S.; Adler, B.; Bolin, C.; Perolat, P. 1999. "*Leptospira* and leptospirosis". *Medisc: Melbourne - Australia*.

- [10] Morgan, J.; Bornstein, S.; Karpati, A.; Bruce, M.; Bolin, C.; Austin, C.; Woods, C.; Lingappa, J.; Langkop, C.; Davis, B.; Graham, D.; Proctor, M.; Ashford, D.; Bajani, M.; Bragg, S.; Shutt, K.; Perkins, B.; Tappero, J. 2002. "Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998". *Clin Infect Dis*, 34:1593 – 1599.
- [11] Narita, M.; Fujitani, S.; Haake, D.; Paterson, D. 2005. "Leptospirosis after recreational exposure to water in the Yaeyama Islands; Japan". *Am J Trop Med Hyg*, 73:652 – 656.
- [12] Vanasco, N.; Fusco, S.; Zanuttini, J.; Manattini, S.; Dalla-Fontana, M.; Prez, J.; Cerrano, D.; Sequeira, M. 2002. "Outbreak of human leptospirosis after a flood in Reconquista; Santa Fe, 1998". *Rev Argent Microbiol*, 34:124 – 131.
- [13] Edwards, C. 2005. "Leptospirosis: the need for clinical research". *Am J Trop Med Hyg*, 73:651.
- [14] Ricaldi, J.; Vinetz, J. 2006. "Leptospirosis in the tropics and in travelers". *Curr Infect Dis Rep*, 8:51 – 58.
- [15] Effler, P.; Pang, L.; Kitsutani, P.; Vorndam, V.; Nakata, M.; Ayers, T.; Elm, J.; Tom, T.; Reiter, P.; Rigau-Perez, J.; Hayes, J.; Mills, K.; Napier, M.; Clark, G.; Gubler, D. 2005. "Dengue fever, Hawaii 2001 - 2002". *Emerg Infect Dis*, 11:742 – 749.
- [16] Wilder-Smith, A.; Gubler, D. 2008. "Geographic expansion of dengue: the impact of international travel". *Med Clin North Am*, 92:1377 – 1390.
- [17] Wilder-Smith, A.; Ooi, E.; Vasudevan, S.; Gubler, D. 2010. "Update on dengue: epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development". *Curr Infect Dis Rep*, 12:157 – 164.
- [18] Deparis, X.; Maréchal, V.; Matheus, S. 2009. "Pathophysiological mechanisms of dengue fever: critical review of current concepts". *Med Trop*, 69:351 – 357.
- [19] Halstead, S. 2008. "Dengue virus-mosquito interactions". *Annu Rev Entomol*, 53:273 – 291.
- [20] Hales, S.; Weinstein, P.; Soares, Y.; Woodward, A. 1999. "El Nino and the dynamics of vectorborne disease transmission". *Environ Health Perspect*, 107:99 – 102.
- [21] Schwartz, E.; Weld, L.; Wilder-Smith, A.; von Sonnenburg, F.; Keystone, J.; Kain, K. 2008. "Seasonality, annual trends, and characteristics of dengue among ill returned travelers, 1997-2006". *Emerg Infect Dis*, 14:1081 – 1088.
- [22] Libraty, D.; Myint, K.; Murray, C.; Gibbons, R.; Mammen, M.; Endy, T.; Li, W.; Vaughn, D.; Nisalak, A.; Kalayanarooj, S.; Hospenthal, D.; Green, S.; Rothman, A.; Ennis, F. 2007. "A comparative study of leptospirosis and dengue in Thai children". *PLoS Negl Trop Dis*, 3:doi:10.1371/journal.pntd.0000111.
- [23] Sanders, E.; Rigau-Pérez, J.; Smits, H.; Deseda, C.; Vorndam, V.; Aye, T.; Spiegel, R.; Weyant, R.; Bragg, S. 1999. "Increase of leptospirosis in dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Rico in 1996". *Am J Trop Med Hyg*, 61:399 – 404.
- [24] Toyokawa, T.; Ohnishi, M.; Koizumi, N. 2011. "Diagnosis of acute leptospirosis". *Expert Rev Anti Infect Ther*, 9:111 – 121.
- [25] Parker, S.; Cubitt, W. 1999. "The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies". *J Clin Pathol*, 52:633 – 639.
- [26] Mei, J.; Alexander, J.; Adam, B.; Hannon, W. 2001. "Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens". *J Nutr*, 131:1631S – 1636S.
- [27] Ruangturakit, S.; Rojanasuphot, S.; Srijuggravanvong, A.; Duangchanda, S.; Nuangplee, S.; Igarashi, A. 1994. "Storage stability of dengue IgM and IgG antibodies in whole blood and serum dried on filter paper strips detected by ELISA". *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 25:560 – 564.
- [28] UNAIDS/WHO Working Group on Global HIV/AIDS/STI Surveillance. 2001. "Guidelines for Using HIV Testing Technologies in Surveillance: Selection, Evaluation, and Implementation". *World Health Organization: Geneva Switzerland*.
- [29] Cole, J.; Sulzer, C.; Pursell, A. 1973. "Improved microtechnique for leptospiral microscopic agglutination test". *Appl Microbiol*, 25:976 – 980.
- [30] Monahan, A.; Miller, I.; Nally, J. 2009. "Leptospirosis: risks during recreational activities". *J Appl Microbiol*, 107:707 – 716.
- [31] Manock, S.; Jacobsen, K.; deBravo, N.; Russell, K.; Negrete, M.; Olson, J.; Sanchez, J.; Blair, P.; Smalligan, R.; Quist, B.; Espín, J.; Espinoza, W.; MacCormick, F.; Fleming, L.; Kochel, T. 2009. "Etiology of acute undifferentiated febrile illness in the Amazon basin of Ecuador". *Am J Trop Med Hyg*, 81:146 – 151.
- [32] Leake, J. 2013. "Outbreak of leptospirosis in Ecuador associated with the El Niño Southern Oscillation [ENSO]". *Personal communication*.

Influence of vegetation types and ground cover on soil water infiltration capacity in a high-altitude páramo ecosystem

Esteban Suárez R.^{1*}, Emilia Arcos¹, Cristhian Moreno¹, Andrea C. Encalada^{1,2} y Maruxa Álvarez³

¹Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales. Campus Cumbayá, Edificio Darwin 005, Casilla Postal 17-1200-841. Quito-Ecuador.

²Universidad de Coimbra, IMAR-CMA Departamento de Ciencias da Vida, Coimbra, Portugal.

³Universidad de Vigo, Departamento de Ecología. España.

*Autor principal/Corresponding author, e-mail: esuarez@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: Diego Cisneros H., Ph.D.

Recibido/Received: 07/11/2012. Aceptado/Accepted: 07/05/2013.

Publicado en línea/Published on Web: 28/06/2013. Impreso/Printed: 06/06/2013.

Abstract

Mountain ecosystems are receiving increasing attention due to their role in the regulation and supply of water for a growing human population, a pattern that is especially important in high altitude ecosystems of the northern Andes (páramo). Although it is commonly accepted that the capacity of soils to retain and regulate water is mostly given by their structure and organic matter content, it could be also influenced by the differences in the depth and nature of plant ground cover in different vegetation types. By performing a series of water infiltration essays in soils under different vegetation or land-use categories in an Ecuadorian páramo, we evaluated the relative contribution of ground vegetation cover to water infiltration capacity. Water infiltration was extremely high under shrubland vegetation and *Polylepis* forest, and decreased markedly under grassland, Pine plantations, and cattle trails. In all cases, the layer of ground vegetation made a significant contribution to total infiltration capacity, as shown by the lower infiltration rates of the essays performed after this layer was removed. Management and restoration of mountain ecosystems should concentrate in the recovery of landscape-level heterogeneity and the protection of the ground vegetation layer that regulates soil micro-climate, and provides additional water storage capacity.

Keywords. Ecuador, páramo, soil, water infiltration capacity, soil cover.

Resumen

Los ecosistemas de montaña están recibiendo mucha atención debido a su importancia en la provisión y regulación de los recursos hídricos, un fenómeno que es especialmente importante en los ecosistemas de altura de los Andes del norte (páramos). Si bien es ampliamente aceptado que la capacidad de los suelos para regular los flujos hidrológicos está básicamente dada por su estructura y su contenido de materia orgánica, esta capacidad también podría estar influenciada por las diferencias en la naturaleza y espesor de la cobertura del suelo en diferentes tipos de vegetación. Mediante una serie de ensayos de infiltración de agua en el suelo en localidades con diferentes tipos de vegetación o usos del suelo en un páramo ecuatoriano, evaluamos la contribución relativa de la cobertura de vegetación rastrera a la capacidad de infiltración de agua en el suelo. Las tasas de infiltración fueron extremadamente altas en las zonas arbustivas y en el bosque de *Polylepis*, pero decrecieron marcadamente en los pajonales, los bosques de pino y los senderos de paso de ganado. En todos los casos, la capa de vegetación rastrera contribuyó significativamente a la capacidad total de infiltración, como se demuestra por la disminución de las tasas de infiltración que reportamos cuando esa capa fue removida experimentalmente. El manejo y la restauración de los ecosistemas de montaña se debería concentrar en la recuperación de la heterogeneidad a nivel del paisaje y en la protección de las capas vegetales rastreras que regulan los microclimas del suelo y proveen una mayor capacidad de infiltración de agua.

Palabras Clave. páramo, Ecuador, suelo, capacidad de infiltración de agua, cobertura de suelo

Introduction

During the past two decades, high altitude ecosystems across the world have received special attention partially

due to the ever-increasing threats that they are experiencing, but also to their crucial role in the regulation of important ecosystem services such as carbon storage,

soil stabilization, and water supply [1–4]. In the particular case of the northern Andes (Venezuela, Colombia, Ecuador and northern Perú), attention has been centered in the disproportionate role that high-altitude ecosystems (>3200 m), hereafter termed páramo, have in water storage and regulation of hydrological flows [5–7]. Despite the isolated and fragmented occurrence of páramo over the Andean highlands, it has been estimated that these ecosystems provide water for irrigation, hydro-power generation, and human consumption for at least 15 million people across the northern Andes, constituting more than 80% of the total water supply for large capital cities such as Bogotá and Quito [8]. To a large extent, this capacity of páramo ecosystems to regulate hydrological flows has been attributed to their deep soils, with excellent structure and high concentrations of organic matter [9, 10]. As a consequence, these soils can store large amounts of water that are slowly released into the streams. However, páramo soils and the vegetation that they support can be very heterogeneous, influencing eco-system functions such as water storage and regulation [7, 11]. In this study, we evaluated the relative contribution of different vegetation types in a high-altitude páramo ecosystem to soil water infiltration capacity as a measure of ecosystem function in this Andean ecosystem.

Previous studies about the hydrological function of páramo ecosystems have focused on the role of soils in controlling water infiltration capacity and on the effect of human activities in this ecosystem function [7, 9, 12–14]. Although the magnitude of these impacts might vary according to site particularities and the intensity of human intervention [5], the majority of studies have shown significant impacts such as decreased levels of infiltration or soil water retention capacity, reduced water yields, or increased erosion rates associated with cropping [6, 9, 14], burning and grazing [6, 14, 15], and afforestation with exotic species [16, 17]. Similarly, most of these studies have found that the decrease in hydrological functioning in páramo ecosystems is usually associated with losses in soil organic matter content, further emphasizing the role that this component has in the regulation of water retention and movement through páramo ecosystems [18]. Thus, although the influence of soil properties in the behavior of soil water is not to be questioned, emphasis in this aspect could lead us to ignore the potential contribution of ground vegetation cover to the water movement and retention in páramo soils.

The role of vegetation on soil water infiltration capacities has been evaluated in several locations around the world. Orradottir et al. [19] found that infiltration rates were significantly lower in grasslands than in Birch dominated woodlands in Iceland. Jimenez et al. [20] reported that undisturbed Andisols in Tenerife Island under native vegetation cover had significantly higher infiltration capacities than soils where the vegetation had been removed for establishment of tree plantations or

agricultural fields. In general, a strong relationship has been found in which soil water infiltration capacities increase as a power law function of and above-ground biomass in water limited ecosystems [21]. Conversely, in mesic areas this relationship does not hold as stated, and variations in infiltration capacity seem to be predominantly explained by soil type. Although this pattern has been tested across a wide range of ecosystem types [21], it has not been evaluated in heterogeneous tropical montane areas where the combination of high altitude, cold and wet climate, and steep topography create a diverse range of vegetation types, and a large spatial variation in their biomass and distribution. Up to date, the extent to which this variation could influence local rates of soil water infiltration remains unexplored. In this paper we use the ecological heterogeneous setting of the high Andes of northeastern Ecuador to assess if different vegetation types in a páramo locality exhibit different soil water infiltration rates, and the relative contribution of ground vegetation cover to the infiltration capacity of soils under different vegetation types.

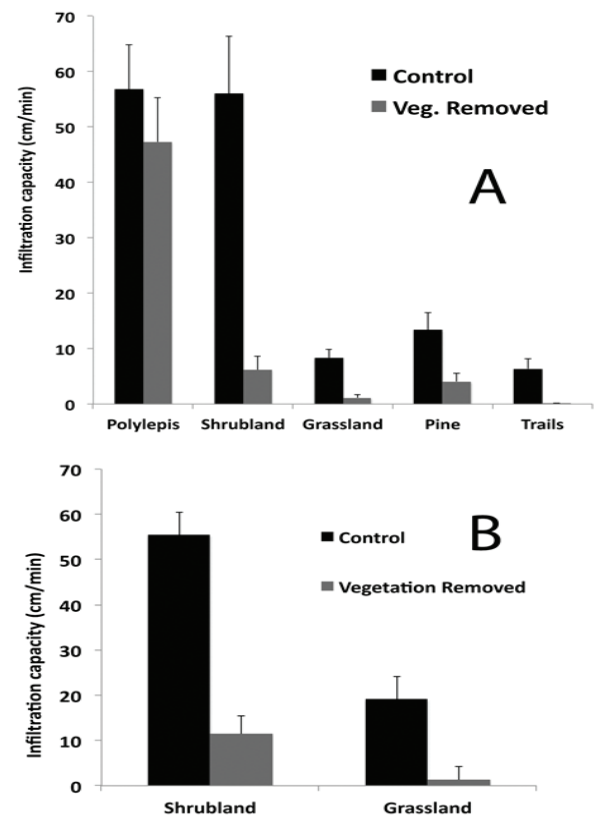


Figure 1: Relative contribution of ground vegetation cover to water infiltration rates in different vegetation or land-use types in a high-altitude páramo ecosystem in northeastern Ecuador. Each bar represents the average (+ standard error) of ten infiltration essays performed in paired soil samples during the dry season of 2010 (A) and wet season of 2011 (B). The first essay of each pair was performed in intact soil, while the second was performed in an adjacent spot in which ground vegetation cover had been removed.

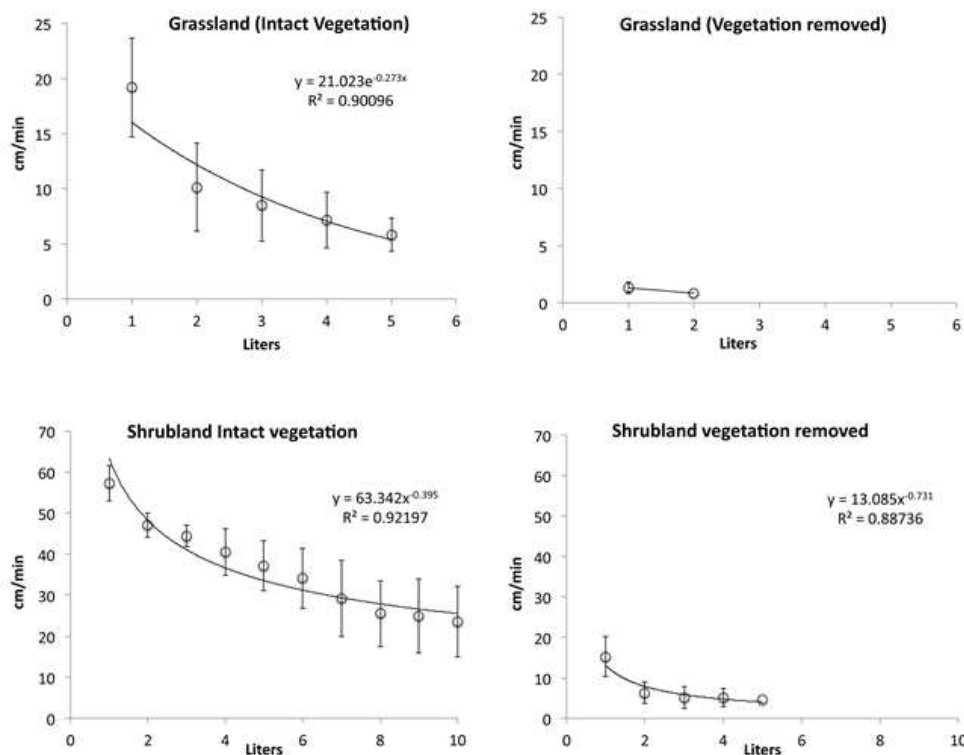


Figure 2: Soil water saturation surveys carried out under shrubland and grassland vegetation in a high-altitude páramo ecosystem in northeastern Ecuador. Essays were performed on intact soils and on soils from which upper vegetation layer had been removed.

Materials and Methods

Study area

This study was carried out in the Paluguillo area, a páramo watershed on the eastern mountain range of the Andean cordillera in northern Ecuador (00° 18.421 S; 078° 13.963 W). Our study sites are located in the west-facing slope of the mountain range, at altitudes between 3600 and 3900 m, and they experience annual means of temperature and precipitation of 6°C and 1300 mm respectively (Estación Meteorológica Paluguillo; Universidad San Francisco de Quito). The native vegetation is characterized by a heterogeneous matrix of páramo grasslands (primarily *Festuca* sp. and *Calamagrostis* sp.), with patches of forest dominated by *Polylepis* spp. and *Gynoxis* sp., and shrublands with a diverse array of woody species such as *Hypericum laricifolium*, *Diplostephium ericoides*, *Pentacalia peruviana*, *Baccharis* spp. and *Loricaria ferruginea*. The area also exhibits patches of vegetation altered by human activities such as roads or trails commonly dominated by dense mats of *Lachemilla orbiculata*, or mono-specific plantations of exotic trees (*i.e.* *Pinus* or *Eucalyptus*). In addition to striking differences in structure and richness of native species, all this vegetation types and land cover categories differ markedly in the nature and composition of the ground cover vegetation, from large mats of bryophytes and herbaceous vegetation up to 15 cm in thickness in shrub dominated patches, to bare ground or dense mono-specific carpets of grazing resistant species such as *Lachemilla orbiculata*, which are mainly distributed in cattle

trails or roads.

In order to assess potential differences in water infiltration capacities of soils under different vegetation types or coverage, we selected representative patches of the following categories: *Polylepis* forest, *Diplostephium ericoides* shrubland; páramo grassland, Pine forests, and hiking trails. This particular order roughly reflects a gradient of increasing levels of human impact from the less disturbed vegetation of the *Polylepis* forest, to the drastically altered vegetation found in cattle trails. All patches were located on flat terrain or exhibited moderate slopes (25-30°) and occurred over typical Andosols, rich in organic matter and derived from volcanic materials.

Infiltration essays

We used a modified infiltration-ring methodology that allows ample replication and large spatial coverage. Although this method cannot be used to estimate infiltration capacities under normal field conditions (the volumes of water poured into the rings are much larger than the volumes that fall during typical rain events), it is useful to characterize potential differences between soils under contrasting vegetation types. We performed a series of infiltration essays using a metal infiltration ring (diameter = 0,17 m). For each essay, we pushed the infiltration ring 10 cm into the soil, trying to cause the least possible disturbance to soil structure. Then, we poured 1L of fresh water, collected in adjacent streams, into the ring, and recorded the time needed for all water

to be absorbed by the soil. Although infiltration rates were extremely high for most soils, in the cases where they were slow we waited for a maximum of ten minutes and then recorded the volume of water remaining in the ring. In no case did we observe lateral flow of water out of the infiltration ring.

In each vegetation type or land-cover category, we carried out ten pairs of randomly located infiltration essays. The first essay of each pair was performed on intact soils in which we conserved the ground cover intact, while the second essay of the pair was performed 2 m away from the location of the first essay, in a spot in which undecomposed organic materials, surface leaf litter (O horizon) and plant ground cover were carefully removed (avoiding disturbance of lower layers) to a depth in which the A horizon was exposed. These essays were performed during the dry season of 2010, between June 28th and September 29th. This period was mostly characterized by very small and sporadic precipitation events, which did not exceed 56 mm per month. The mean difference in water infiltration rates between intact and bare soil sampling spots was used to estimate the relative contribution of ground vegetation cover to water infiltration capacity in each vegetation or land-cover category. In order to assess potential seasonal differences in the patterns of water infiltration capacities, we performed a second set of infiltration essays during the wet season, in April 2011. Because of logistical constraints, essays in this period were restricted to the shrubland and grassland vegetation types.

During the second sampling period we performed four individual soil-saturation tests in shrubland and grassland vegetation types. The purpose of these tests was to estimate the volume of water needed to saturate these páramo soils, both when vegetation cover is intact and when it has been removed. For each tests, we placed the infiltration ring as described above, and successively poured individual 1L-volumes of water, recording in each case the time needed for all the water to infiltrate the soil. We kept adding additional water volumes, until the infiltration time for the last liter of water exceeded 5 minutes. Four saturation tests were performed with the ground vegetation layer intact (control), and four were performed after this layer had been removed.

In addition to the infiltration essays, we collected the ground cover layer removed from each sample during the water infiltration essays. These samples were taken to the laboratory, dried for 24 hours at 70°C, and weighed to estimate total biomass in this layer. Immediately after the infiltration essays of the dry season, we collected soil samples (0-10 cm) in five of the sampling spots used for the water infiltration essays in each vegetation or land-cover category. These samples were air dried, passed through a sieve (mesh-size 2 mm) and analyzed for organic matter content using the Walkley-Black acid digestion method.

The effects of vegetation type and the presence or absence of the ground vegetation cover on water infiltra-

tion rates were evaluated through a two-way analysis of variance, whereas the influence of organic matter and the biomass of ground vegetation cover were assessed by ANCOVA, in which the amount of organic matter (%) was treated as covariate. All the analyses were performed on un-transformed data after assumptions of equal variance and normal distributions were tested.

Results

During the dry season, water infiltration rates differed significantly between vegetation or land-cover categories (Table 1) and achieved the highest values in the undisturbed páramo vegetation (*Polylepis* forest and páramo shrubland), averaging 56 cm/min (Figure 1). These infiltration capacities in undisturbed vegetation were between four and five times higher than comparable values measured in the páramo grassland (mean \pm SE = 8.4 cm/min \pm 1.5), the pine plantation (13.4 cm/min \pm 3.0) and the trails (6.4 cm/min \pm 1.7; Figure 1). In all land cover categories, water infiltration rates were higher in the control treatments, than in the infiltration essays performed after removing the ground vegetation layer (Figure 1). These differences were especially large in the shrubland, grassland, and Pine forest categories, where the infiltration rates in the control essays were between three and eight times higher than those estimated in the vegetation removal treatments.

Water infiltration capacities measured during the wet season in the shrubland (55.5 cm/min \pm 2.6) and grassland (19.17 cm/min \pm 4.5) vegetation types, were extremely similar to those measured during the dry season (Figure 1). Differences between control and infiltration essays performed after removal of the ground vegetation layer were also similar to those measured during the first sampling period (Figure 1). These patterns

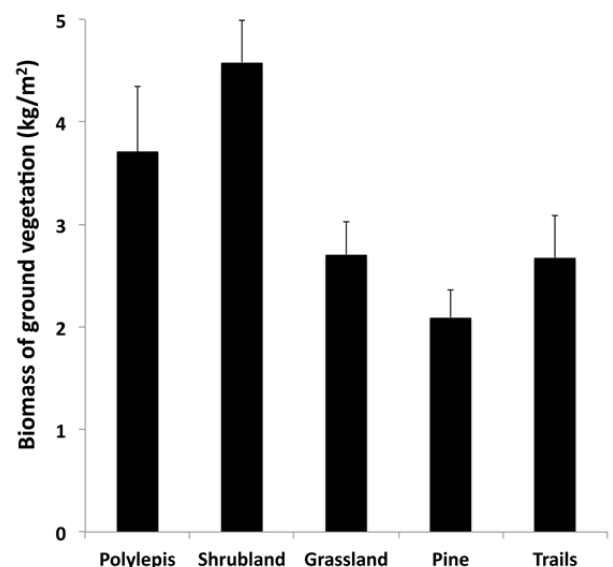


Figure 3: Biomass of the ground vegetation layer in different vegetation or land-use types in a high-altitude páramo ecosystem in northeastern Ecuador. Each bar represents the average (+ standard error) of ten samples.

	DF	SS	Mean Square	F	Pr > F
Intercept	1	322.6	322.6	392.01	0.000000
Vegetation Type	4	148.0	37.0	44.96	0.000000
Treatment	1	69.0	69.0	83.89	0.000000
Vegetation Type *Treatment	4	21.3	5.3	6.49	0.000123
Error	90	74.0	0.8		

Table 1: Results of ANOVA performed on the rates of soil water infiltration in different vegetation or land-cover categories in a high-altitude páramo ecosystem in northeastern Ecuador. Infiltration rate was the dependent variable, analyzed against five levels of the factor “vegetation type” and two levels of the factor “treatment”: intact soil infiltration essays, versus removal of the ground surface vegetation cover before the infiltration essay.

were also observed during the soil saturation essays performed during the wet season. When the ground vegetation cover was intact, soil saturation followed a shallow power or exponential function, which retained considerable infiltration capacities even after more than 5 L of water had been poured in the infiltration ring, especially under shrubland vegetation (Figure 2). Saturation essays performed after removal of the ground vegetation were extremely short and demanded only 2 to 5 lt of water to saturate the soil (Figure 2).

Biomass of the ground vegetation differed among veg-

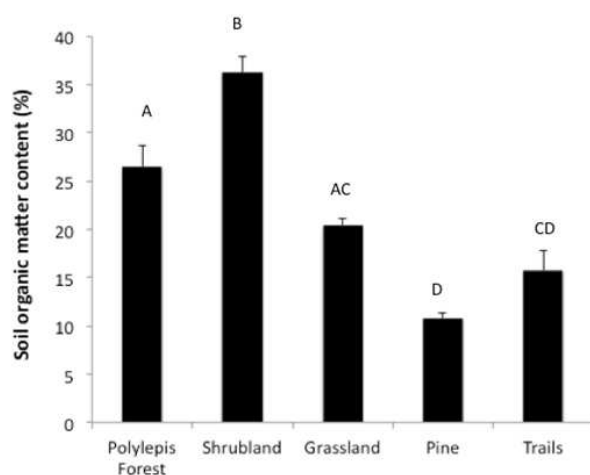


Figure 4: Soil organic matter content under different vegetation or land-use types in a high-altitude páramo ecosystem in northeastern Ecuador. Each bar represents the average (+ standard error) of five samples taken randomly from the first 10 cm of soil.

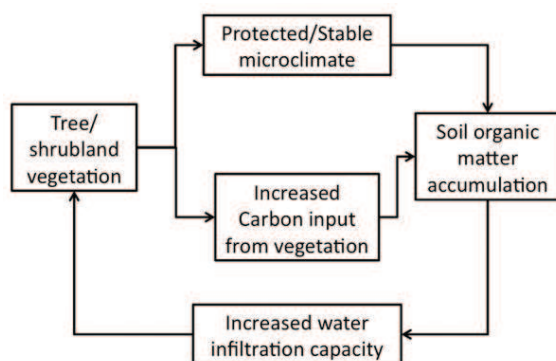


Figure 5: Schematic representation of the hypothesized relationships between plant cover, soil organic matter, and water infiltration capacity in páramo ecosystems in the Ecuadorian Andean páramo.

etation and land-cover types, and exhibited the highest values in the shrubland and *Polylepis* patches (3.7-4.5 kg/m²; Figure 3). In the case of these vegetation types, the ground cover was characterized by a thick mat of mosses (up to 10 cm high) and partly decomposed plant materials (mainly Bryophytes) which completely covered the soil, leaving virtually no bare ground. In the páramo grassland, a dense mat of decomposing grass leaves and roots predominantly composed the grassland ground cover, which was not continuous and reached approximately 70 to 80% of the area of the interstices between grass tussocks. The biomass of ground plant cover in the pine forest and the trails did not differ significantly from the biomass in the grassland patches (Figure 3), but its nature is different. In the case of the Pine forests, a thick layer of pine needles formed it, whereas in the trails it was composed of a dense mat of *Lachemilla orbiculata* (Rosaceae), a grazing resistant plant that forms extremely dense carpets in disturbed páramo ecosystems.

Soil organic matter content was very high in the undisturbed vegetation patches, averaging 36% ± 1.7 in the shrubland vegetation, and 26% ± 2.2 in the *Polylepis* forest (Figure 4). These values differed significantly from those measured in the disturbed vegetation patches, achieving the lowest organic matter contents in the Pine forest soils (10.8% ± 0.6; Figure 4). Despite these significant differences in organic matter content among land cover categories (Figure 4; Table 2), this variable was not a significant predictor of water infiltration capacities. On the contrary, the analysis of covariance performed on infiltration data, showed that the best predictor of soil infiltration capacity was the biomass of the ground vegetation layer, whereas the organic matter content, treated as a covariate, showed no significant effects (Table 2).

Conclusions

Differences in soil water infiltration capacities have been frequently related to the amounts of organic matter stored in the soil, especially in mesic regions where well-developed soils with large stocks of organic material usually exhibit higher water storage capacities and infiltration rates [21]. This relationship, however, minimizes the potential role that ground vegetation cover could have in the hydrological behavior of soils, a role that could be significant in mountain regions where the topographical and altitudinal gradients produce an extremely

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F	Pr > F
Vegetation Type	4	6983.4	1745.8	69.57	<0.0001
Organic matter (%)	1	38.5	38.5	1.53	0.2314
Biomass (g)	1	164.4	164.4	6.55	0.0197

Table 2: Results of ANCOVA performed on the rates of soil water infiltration in different vegetation or land-use types in a high-altitude páramo ecosystem in northeastern Ecuador. Infiltration rate was the dependent variable, analyzed against five levels of the factor “vegetation type” and the biomass (g) of the ground surface vegetation cover and content of soil organic matter (covariate) as independent variables. Organic matter * Biomass interaction was not significant and consequently was dropped from the model.

heterogeneous vegetation matrix. In this context, the main purpose of our study was to assess if contrasting vegetation or land-use categories in an Andean páramo exhibit different soil water infiltration capacities.

Our results confirmed the extremely high infiltration capacities that commonly characterize organic matter-rich soils in general, and Andean Andosols in particular. The infiltration rates that we measured in the shrubland páramo and the *Polylepis* forest (20 and 50 cm/min) are almost one order of magnitude higher than common infiltration rates reported for other Andosols [20]. Interestingly, these high infiltration capacities did not varied significantly between dry and rainy seasons, suggesting that they are not an artifact of soil water content at the moment of our sampling. This conclusion is further supported by the saturation essays that we performed during the wet season, which showed that intact páramo soils, such as those found in our study site, can receive large volumes of water without altering significantly their water infiltration capacities. According the models developed during these essays (Figure 2), the volume of water needed to decrease the initial infiltration capacity by 50% were 2.5 liters for the grassland vegetation, and 7.5 liters for the shrubland vegetation.

Our data suggest that the hydrological behavior of high-altitude Andean ecosystems is extremely heterogeneous and is influenced by the nature of the vegetation cover and type of land-use. More specifically, in this study we show that common land-use practices that are currently affecting páramo ecosystems, such as afforestation with exotic species, or the burning and accompanying cattle rising, are associated with i) changes in the structure of the vegetation, including the vegetation ground layer, ii) a significant decrease of soil organic matter content, and iii) a drastic reduction in the water infiltration capacity of the soil (Figures 1 and 2). Although the scale of our study is different, our results support previous research that reports changes in the hydrological behavior of páramo soils exposed to land-use changes. For example, Buytaert et al. [16] reported that an Ecuadorian páramo watershed planted with the exotic *Pinus patula*, exhibited water yields that were 50% smaller than those in a control watershed. At the local level, these watershed-scale changes are probably related to losses of organic matter and water retention capacities of the soil as those reported by [15] in overgrazed páramo ecosystems, or [7] in páramo pine plantations, and to increased erosion and reduction in infiltration capacities such as those reported in this study (Figure 1), and in other Ecuadorian páramo ecosystems

exposed to burning and grazing [14].

The water infiltration capacities that we measured in the shrubland páramo and the *Polylepis* forests are extremely high. In accordance to previous studies [7, 9, 10], we attribute this pattern to the high content of organic matter (25 to 35%; Figure 4) and to the excellent structure that characterize the Andosols in our study area and in other páramo localities. However, our results also suggest that soil organic matter content alone cannot explain the great variation and the extremely high infiltration capacities that we report in this study. In fact, the biomass and the characteristics of the ground vegetation layer that covers the soil were a more powerful predictor of soil water infiltration capacities that we measured in the field. From this perspective, the modification in vegetation structure that follows land-use change in the páramo (i.e. removal of *Polylepis* forests or shrubby vegetation by repeated fires, and the homogenization of grasslands or establishment of exotic tree plantations), affects the hydrological behavior of páramo ecosystems not only by reducing the content of SOM, but also by changing the nature of the ground vegetation cover of the soil.

Although previous studies have already highlighted the influence of aboveground biomass on the water infiltration capacity of soils, emphasis has been commonly put on the effects of total aboveground biomass [19, 21–23]. Although in our study area the vegetation types with higher infiltration capacities (*Polylepis* and shrubland) were also those with higher aboveground biomass (R. Sierra and E. Suárez, pers. obs.), in this study we highlight the influence of a more specific ecosystem component, the layer of plant materials covering the soil surface. This layer made a significant contribution to the total infiltration capacity of soil under the majority of the vegetation types that we analyzed. In fact, our data showed that its removal resulted in water infiltration rates that were between two and six times slower than the rates obtained from control infiltration essays (Figure 1). We hypothesize that this contribution of the plant ground cover to total infiltration capacities are probably due to the capacity of this layer of to absorb water when its plant materials (dead and alive) are not saturated; and, the creation of a complex and dense spatial structure which serves as a sponge, providing additional space for water storage.

From this perspective, we suggest that the maintenance of the thick ground layer could be crucial in terms of sustaining the water regulation capacity of páramo and

other high-altitude ecosystems. In the case of the páramo, and based on available information [24–27], we suggest that the persistence and magnitude of this layer might be dependent on the microclimate created by the closed canopy of the shrubs or trees that dominate areas with low levels of human intervention. In these areas, thick vegetation cover might ameliorate the huge temperature variations that characterize these ecosystems, keeping a higher moisture content which facilitates development of a thick layer of mosses and other ground vegetation (Figure 5). Together with increased inputs of plant materials to the soil, a more stable and humid microclimate might promote higher accumulation of soil organic matter, further increasing the water infiltration capacity of the soil, and the conditions that ultimately favor the persistence of shrubland or forest vegetation in the páramo. In the same way, elimination of the shrubland vegetation as occur after repeated fires, or forest clearing, would start a negative feedback that alters the microclimate and organic matter inputs to the soil, reducing the content of soil organic matter, and water infiltration capacities. Although some of the proposed links along this feedback chain (Figure 5) have not been analyzed, this framework could provide a useful way to think about restoration of the hydrological properties of páramo soils that have been degraded by human activities. In the case of the Andean páramos and other mountain ecosystems around the world, this will become increasingly important as the human demand for water resources increase, along with the land-use pressures that currently affect high-altitude ecosystems [5, 28, 29].

For this study, we used a modified infiltration-ring methodology that allows ample replication and large spatial coverage. This method cannot be used to estimate infiltration capacities under normal field conditions, because the volumes of water poured into the rings are much larger than the volumes that fall during typical rain events. From this perspective, the high infiltration capacities that we measured in this study must be considered cautiously, specially regarding their contribution to large-scale hydrological behavior, and should not be extrapolated to watershed-level calculations. Our discussion emphasizes not the overall magnitude of the water infiltration rates in our study sites, but the relative differences between vegetation types, and the role of the ground vegetation cover. New studies should be conducted to evaluate the magnitude of the infiltration patterns under normal field conditions.

In conclusion, our data suggest that the large differences observed in water infiltration capacities of soils under different vegetation or land-cover categories, could have significant impacts in the hydrological behavior of páramo ecosystems. An area dominated by shrubland or *Polylepis* forest, for example, could have a better capacity for water regulation than a comparable area dominated by páramo grassland, or Pine plantations. Current management practices, however, tend to homogenize the páramo ecosystems, favoring the development

of large tracts of grasslands, with low coverage of shrublands and native forests. From this perspective, we suggest that future management and restoration initiatives should be aimed at trying to restore a more complex matrix of grasslands, shrublands and native forests, which likely will favor both, biodiversity conservation, and the maintenance of the critical ecosystem services that we draw from mountain ecosystems.

Acknowledgments

This study was funded by the Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID), through the project A/023862/09, carried out by Universidad de Vigo and Universidad San Francisco de Quito. Special thanks to Braulio Catagna for his help during fieldwork, and to the Paluguillo Reserve and The Nature Conservancy for their support during this research and for granting access to their research facilities and study sites. This manuscript was greatly improved with comments by two anonymous reviewers and by Adolfo Cor-dero and Eduardo Campuzano.

References

- [1] Messerli, B.; Viviroli, D.; Wiengartner, R. 2004. "Mountain of the world: vulnerable water towers for the 21st century". *Ambio*, 13:29 – 34.
- [2] Viviroli, D.; Weingartner, R. 2004. "The hydrological significance of mountains: from regional to global scale". *Hydrology and Earth System Sciences*, 8:1016 – 1029.
- [3] Viviroli, D.; Weingartner, R.; Messerli, B. 2003. "Assessing the hydrological significance of the world's mountains". *Mountain Research and Development*, 23:32 – 40.
- [4] Farley, K.; Jobbágy, E.; Jackson, R. 2005. "Effects of afforestation on water yield: a global synthesis with implications for policy". *Global Change Biology*, 11:1565 – 1576.
- [5] Buytaert, W. 2006. "Human impact on the hydrology of the Andean paramos". *Earth-Sci*, 79:53 – 72.
- [6] Buytaert, W. 2002. "Impact of land use changes on the hydrological properties of volcanic ash soils in South Ecuador". *Soil Use and Management*, 18:94 – 100.
- [7] Farley, K.; Kelly, E.; Hofstede, R. 2004. "Soil Organic Carbon and Water Retention after Conversion of Grasslands to Pine Plantation in the Ecuadorian Andes". *Ecosystems*, 7:729 – 739.
- [8] Josse, C.; Mena, P.; Medina, G. 1999. "El páramo como fuente de recursos hídricos". *GTP/Abya Yala, Quito*, 3.
- [9] Podwojewski, P.; Janeau, J.; Leroux, Y. 2008. "Effects of agricultural practices on the hydrodynamics of a deep tilled hardened volcanic ash-soil (Cangahua) in Ecuador". *Catena*, 72:179 – 190.

- [10] Poulénard, J.; Podwojewski, P.; Herbillon, A. 2003. "Characteristics of non-allophanic Andisols with hydric properties from the Ecuadorian paramos". *Geoderma*, 117:267 – 281.
- [11] Hofstede, R.; Groenendijk, J.; Cuppus, R.; Fehse, J.; Sevink, J. 2002. "Impact of pine plantations on soils and vegetation in the Ecuadorian high Andes". *Mountain Research and Development*, 22:159 – 167.
- [12] Hofstede, R.; Sevink, J. 1995. "Water and nutrient storage and input:output budgets in burned, grazed and undisturbed páramo grasslands". en: *Effects of burning and grazing on a Colombian páramo ecosystem. Ph.D. Dissertation. University of Amsterdam: The Netherlands*, 121 – 147.
- [13] Poulénard, J.; Michel, J.; Bartoli, F.; Portal, J.; Podwojewski, P. 2004. "Water repellency of volcanic ash soils from Ecuadorian paramo: effect of water content and characteristics of hydrophobic organic matter". *European Journal of Soil Science*, 55:487 – 496.
- [14] Poulénard, J.; Podwojewski, P.; Janeau, J.; Collinet, J. 2001. "Runoff and soil erosion under rainfall simulation of Andisols from the Ecuadorian páramo: effect of tillage and burning". *Catena*, 45:185 – 207.
- [15] Podwojewski, P.; Poulénard, J.; Zambrano, T.; Hofstede, R. 2002. "Overgrazing effects on vegetation cover and properties of volcanic ash soil in the páramo of Llangahua and La Esperanza (Tungurahua, Ecuador)". *Soil Use and Management*, 18:45 – 55.
- [16] Buytaert, W.; Iñiguez, V.; De Bièvre, B. 2007. "The effects of afforestation and cultivation on water yield in the Andean páramo". *Forest Ecology and Management*, 251:22 – 30.
- [17] Farley, K.; Kelly, E. 2004. "Effects of afforestation of a páramo grassland on soil nutrient status". *Forest Ecology and Management*, 195:281 – 290.
- [18] Podwojewski, P.; Poulénard, J. 2004. "Paramo Soils". *Encyclopedia of Soil Science*: 1 – 4.
- [19] Orradottir, B.; Archer, S.; Arnalds, O.; Wilding, L.; Thurow, T. 2008. "Infiltration in Icelandic Andisols: the role of vegetation and soil frost". *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 40:412 – 421.
- [20] Jiménez, C.; Tejedor, M.; Morillas, G.; Neris, J. 2006. "Infiltration rate in andisols: Effect of changes in vegetation cover (Tenerife, Spain)". *Journal of Soil and Water Conservation*, 61:153 – 158.
- [21] Thompson, S.; Harman, C.; Heine, P.; Katul, G. 2010. "Vegetation-infiltration relationships across climatic and soil type gradients". *Journal of Geophysical Research*, 115:1 – 12.
- [22] González-Pelayo, O.; Andreu, V.; Gimeno-García, E.; Campo, J.; Rubio, J. 2010. "Effects of fire and vegetation cover on hydrological characteristics of a Mediterranean shrubland soil". *Hydrological Processes*, 24:1504 – 1513.
- [23] Yimer, F.; Messing, I.; Ledin, S.; Abdelkadir, A. 2008. "Effects of different land use types on infiltration capacity in a catchment in the highlands of Ethiopia". *Soil Use and Management*, 24:344 – 349.
- [24] Hofstede, R.; Mondragón, M.; Rocha, C. 1995. "Biomass of grazed, burned, and undisturbed páramo grasslands, Colombia I. Above ground vegetation". *Arctic and Alpine Research*, 27:1 – 12.
- [25] Ramsay, P.; Oxley, E. 1997. "The growth form composition of plant communities in the ecuadorian paramos". *Plant Ecology*, 131:173 – 192.
- [26] Sklenár, P.; Ramsay, P. 2001. "Diversity of zonal páramo plant communities in Ecuador". *Diversity and Distributions*, 7:113 – 124.
- [27] Suárez, E.; Medina, G. 2001. "Vegetation structure and soil properties in Ecuadorian páramo grasslands with different histories of burning and grazing". *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 33:158 – 164.
- [28] Buytaert, W.; Iñiguez, V.; de Bièvre, B. 2006. "The impact of climate change on the water supply of the Andean highlands". *Geophysical Research Abstracts*. 8.
- [29] Bradley, R.; Vuille, M.; Diaz, H.; Vergara, W. 2006. "Threats to Water Supplies in the Tropical Andes". *Science*, 312:1755 – 1756.

Genetic Diversity and Conservation of the Misty Grouper (*Hyporthodus mystacinus*) in the Galapagos Islands, Ecuador

Alexandra M. Avila^{1*}, Carlos A. Valle¹ y Ana M. Troya¹

¹Universidad San Francisco de Quito, Maestría en Ecología,

Calle Diego de Robles y Vía Interoceánica, Campus Cumbayá,

Quito, Ecuador—Galapagos Institute for the Arts and Sciences (GAIAS)

*Autor principal/Corresponding author, e-mail: alexandra.m.avila@gmail.com

Editado por/Edited by: Cesar Zambrano, Ph.D.

Recibido/Received: 13/05/2013. Aceptado/Accepted: 31/05/2013.

Publicado en línea/Published on Web: 28/06/2013. Impreso/Printed: 06/06/2013.

Abstract

Overexploitation now threatens more than 90% of marine fisheries worldwide. Overfishing has been widely recognized as impacting species diversity and abundance; however, its effects on marine fish genetic diversity have been largely ignored. The groupers (Serranidae) are a commercially important family of fish in many parts of the world including in the Galapagos Islands. A recent assessment of the family by the groupers and wrasse specialist group (GWSG), suggested that the group might be particularly vulnerable to fishing, and it has also been suggested that their genetic diversity may be threatened due to overfishing [1]. One of the groupers studied, was the misty grouper *Epinephelus mystacinus* [2], recently renamed *Hyporthodus mystacinus* [3]. *H. mystacinus* was categorized as Least Concern (LC) in 2008 by the IUCN and in the GWSG final report, due to the fact that virtually nothing is known about its natural history [4, 5]. The final report of the GWSG states that all LC species should be the immediate focus of more data-gathering, especially in Southeast Asia and the Pacific islands [1]. The sampling of 108 fin clippings of misty groupers *H. mystacinus* through the Archipelago was conducted by Galapagos local fishermen. Following the procedures described in Craig et al.[6], DNA from the sample tissues was extracted, and new primers were developed from the microsatellite loci identified by Ramirez et al (2006) [7]. Our results suggest great levels of gene flow among the localities, due to the fact that there are no real geographic barriers to separate the individuals from one locality from the next. High genetic diversity has traditionally been associated with good health of populations, and may signal a good future for traditional fishing of *H. mystacinus* through sustainable management practices.

Keywords. Genetic Diversity, Conservation, Misty Grouper, *Hyporthodus mystacinus*, Galapagos, Fisheries, Genetics

Resumen

Más del 90% de la pesca marina en todo el mundo se encuentra sobre explotada o muy cerca a este punto. En el pasado, la sobrepesca fue ampliamente reconocido como teniendo un gran impacto sobre la diversidad y abundancia de especies, sin embargo, sus efectos sobre los ecosistemas marinos y la diversidad genética de peces han sido ampliamente ignoradas. Los meros (Serranidae) son una familia de peces con una importancia comercial en muchas partes del mundo, así como en las Islas Galápagos. Las evaluaciones recientes de la familia sugieren que el grupo podría ser particularmente vulnerables a la pesca [1], que su diversidad genética puede verse amenazada debido a la sobrepesca [1]. De acuerdo con el grupo de especialistas de los meros y peces (GWSG por sus siglas en Inglés), una evaluación de todas las especies de mero es necesaria para examinar la familia entera y darles prioridades de gestión y conservación de acuerdo a cada caso [1]. Uno de los meros estudiado, la Misty Grouper *Epinephelus mystacinus* [2], recientemente renombrada *Hyporthodus mystacinus* [3], ha sido descrito como un pez misterioso y raramente avistado (especies de meros Schobernd 2004). *H. mystacinus* se clasificó como de Preocupación Menor en 2008 por la UICN y en el informe final GWSG. Esto se debe al hecho de que prácticamente nada se sabe acerca de la edad, el crecimiento y la reproducción de esta especie [4, 5]. El informe final de GWSG dice que todas las especies clasificadas como DD y especies LC deben ser el objetivo inmediato de más de recopilación de datos, especialmente en el sudeste de Asia y las islas del Pacífico [1]. Se encontró alta diversidad genética y gran flujo génico para *H. mystacinus* entre las localidades de las Islas Galápagos. Una alta diversidad genética se ha asociado tradicionalmente con la buena salud de las poblaciones, y se considera una señal de un buen futuro para la pesca tradicional de la *H. mystacinus*. Por lo tanto, para que la pesca de *H. mystacinus* pueda continuar a un nivel sostenible, es imprescindible mantener una alta diversidad genética a través de un buen plan de manejo.

Palabras Clave. Diversidad Genética, Conservación, Mero, *Hyporthodus mystacinus*, Galápagos, Pesquerías, Genética

Introduction

Genetic diversity, the raw material for adaptive evolution, is fundamental for the conservation of threatened populations [8] like the overexploited fisheries. Low genetic diversity and increased homozygosity, which often leads to reduced fitness, resulting from small population size may become exacerbated among isolated or highly structured populations thus severely constraining their potential to respond by adapting to a changing environment [9–12].

Populations with low genetic diversity are more vulnerable to demographic and environmental stochasticity, which could cause this population to face several genetic threats [12–14]. In addition, due to a small population size mating becomes restricted and inbreeding becomes more likely. Small and/or isolated populations lose the genetic variation necessary to respond to environmental challenges [9, 15, 16]. Of these processes, inbreeding poses a more immediate threat, whereas genetic drift and mutation accumulation affect the population in the long term [14, 16, 17]. Low genetic diversity can pose a direct threat to conservation of a species. Low genetic diversity can result from a small population size, although this is not always the case since besides genetic drift low genetic diversity can also be attributed to sweepstakes recruitment, or selective sweeps [9, 13]. The genetic diversity of a population can tell us a lot about the state or health of a population, and it can also help estimate the size of the population [18].

Another critical component of any study of genetic diversity of a population is to quantify rates of exchange, or population connectivity, among subpopulations of said organism [19]. Patterns of connectivity among subpopulations of marine organisms are determined by interactions between biological phenomena including life history characteristics and larval behavior, and physical processes of advection and diffusion [20, 21]. Population connectivity is relevant to a fundamental understanding of marine ecological processes and is directly applicable to critical human and environmental impact on the fisheries [21, 22]. An understanding of population connectivity could potentially benefit management strategies including marine protected areas (MPAs), yet information on this subject is lacking to make proper fisheries management decision [19]. In order to fill this knowledge void, the nature of the connectivity problem will require a diverse toolbox of techniques of molecular and genetic research (among others) [20–22].

The role of genetic diversity and connectivity has been an issue largely neglected by fisheries ecologists and fisheries conservation biologists. This may be partly due to the fact that genetic theory suggests that significant loss of genetic diversity only occurs in very small populations while the “collapsed” stocks are made up by several million individuals [23]. However, during the past decade questions relating to biological diversity, genetic vulnerability, narrowing of the gene base of

important cultivars and the loss of germplasm of commercially important species have received increasing attention [24]. An in-depth knowledge of genetics is urgent because more than 90% of marine fisheries worldwide are now either overexploited or nearing this point [25]. In the past, overfishing was widely recognized as impacting species diversity and abundance; however, its effects on marine fish genetic diversity have been largely ignored.

The groupers (Serranidae) are a commercially important family of fish in many parts of the world as well as in the Galapagos Islands. According to the Groupers and Wrasse Specialist Group (GWSG), an initial assessment of all grouper species is needed to examine the sub-family as a whole and set conservation and management priorities as necessary [1]. Recent assessments of the family suggest that the group might be particularly vulnerable to fishing [1], and it has also been suggested that their genetic diversity may be threatened due to overfishing [1]. One of the groupers studied, the misty grouper *Epinephelus mystacinus* [2], was recently renamed *Hyporthodus mystacinus* [3] and was categorized as Least Concern in 2008 by the IUCN and in the GWSG final report. This is due to the fact that virtually nothing is known about the age, growth, and reproduction of this species [4, 5]. The final report of the GWSG states that all larger Data Deficient (DD) and Least Concern (LC) species should be the immediate focus of more data-gathering, especially in Southeast Asia and the Pacific islands [1].

A study by Hauser et al (2002) [23] of the New Zealand snapper (*Pagrus auratus*) fisheries pointed out that threats to the genetic diversity of marine fish populations have so far been largely neglected partially due to the fact that even “collapsed” stocks usually consist of several million individuals, whereas population genetics theory suggests that only very small populations suffer significant loss of genetic diversity [23]. Hauser et al concluded that if such low ratios of genetically effective population size to number of fish in a population are commonplace in marine species, many exploited marine fish stocks may be in danger of losing genetic variability, potentially resulting in reduced adaptability, population resistance, and productivity [23].

This study focuses on the population genetics of the misty grouper (*H. mystacinus*) on the Galapagos Islands a presumably small closed population on the way to becoming overfished or at least in the process of becoming an important commercial fishery both worldwide and in the Galapagos [27, 28]. Specifically, the objective of this study is to assess the misty grouper population’s genetic health by analyzing the population genetic variability throughout the Galapagos archipelago using microsatellites. Based on the results from genetic analyses I aim to suggest possible management alternatives to the local conservation authority (the Galapagos National Park) that would prevent overfishing of *H. mystacinus*. Finally, this study had a social aspect, in

ID	Locus	Accession Number	Primer Sequence	
			Forward	Reverse
A	RHCA002	DQ223785	CTCGTTACCACATCGGGACT	AAGGGCATGATGGGAAATG
B	RHCA007	DQ223786	CAGAAACATCTCCCCAAA	CTGGCAGAGCAATTAGAGGC
C	RHGATA015	DQ223821	TGTTCCCATGTGTCTGCTTTAG	TGTTCCCATGTGTCTGCTTTAG
D	RHGATA032	DQ223824	ATGTGCATTTATGGAGTTTCCC	ATGTGCATTTATGGAGTTTCCC
E	RHGATA035	DQ223826	CAGGTCAGCTCTCCCATGATAC	CAGGTCAGCTCTCCCATGATAC
F	RHGATA053	DQ223829	ATGTGCATTTATGGAGTTTCCC	ATGTGCATTTATGGAGTTTCCC
G	RHGATA065	DQ223834	AGGGAGCCACACACAGATAAAG	AGGGAGCCACACACAGATAAAG
H	RHGATA067	DQ223836	GCCAGCCACATACACACG	GCCAGCCACATACACACG
I	RHGATA076	DQ223837	CCATTTACTGTGGAGGTGACAG	CCATTTACTGTGGAGGTGACAG
J	RHGATA106	DQ223843	TAAGTACACATGGACTGACCC	TAAGTACACATGGACTGACCC
K	RHGATA118	DQ223844	CCTGTGGTTAAAGAGACAATCG	CCTGTGGTTAAAGAGACAATCG
L	RHGATA133	DQ223850	ATGTGCATTTATGGAGTTTCCC	ATGTGCATTTATGGAGTTTCCC

Table 1: Twelve microsatellite loci and PCR primers used on *Hyporthodus mystacinus*. RHCA002 and RHCA007 developed by Ramirez et al (2006) [7] RHGATA primers were developed as part of this study using microsatellites loci from an *Epinephelus guttatus* identified by Ramirez et al (2006) [7] and using the websat software [26].

which I created an environmental awareness of the shifting baselines among the younger generations of fishermen, in hopes that this would help conservation efforts of *H. mystacinus* as a species and as a commercially important fishery.

Methods

Research Site and Sample Collection

The sampling of 108 fin clippings of misty groupers *H. mystacinus* through the Archipelago was conducted by Galapagos local fishermen during the February to April 2011 fishing season fishermen in Puerto Baquerizo Moreno, San Cristobal Island, Galapagos, Ecuador. Efforts were made to involve fishermen from Santa Cruz and Isabela Islands but the main source of fish samples come from landings on San Cristobal Island where

most landings usually take place [27, 28] Tissue samples were collected from six localities of the Galapagos Archipelago (Figure 1): Banco, Genovesa, Isanco, La Oso, Pinta, and Darwin/Wolf. Several attempts were made to obtain samples from the mainland, but they were unsuccessful due to the fact that fishermen on the mainland do not fish *H. mystacinus* commercially. All of the fishing of *H. mystacinus* occurred at seamounts, according to the GPS coordinates given by the fishermen (see Figure 4).

The fin clips taken from specimens captured by the local fishermen, were placed in plastic containers with 95% ethanol and stored at room temperature. The fishermen took GPS locations of the fishing sites of *H. mystacinus*, which were then overlaid with Bathymetry maps, to determine habitat selection or preferences. Unfortunately some of the samples were lost and the final data analysis was conducted on the remaining 88 samples. Samples were transported to mainland Ecuador and analyses were conducted at "One Lab" in Ballenita, Province of Santa Elena, Ecuador.

Genetic Analysis

Following the procedures described in Craig et al. (2009) [6], DNA from the sample tissues were extracted using the DNEasy isolation kit (Qiagen) following manufacturer's protocols. The subsequent extracted DNA was archived at -20°C . Primers developed by Ramirez et al (2006) for a sister species (*Epinephelus guttatus*) were initially tested on *H. mystacinus*. Due to poor results from all but two of the primers (RHCA002 and RHCA007), new primers were developed from the microsatellite loci identified by Ramirez et al (2006) [7] and using the software websat [26]. Out of the 38 primers designed 12 were successful in amplifying loci for *H. mystacinus* and yielded a higher consistent allelic variation (see Table 1). Touchdown Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed in an ABI 9700 384 well twin block thermocycler to amplify an approximately 74-378 base pair (bp). Reactions were conducted in a total volume of $4\mu\text{l}$ using the conditions described as

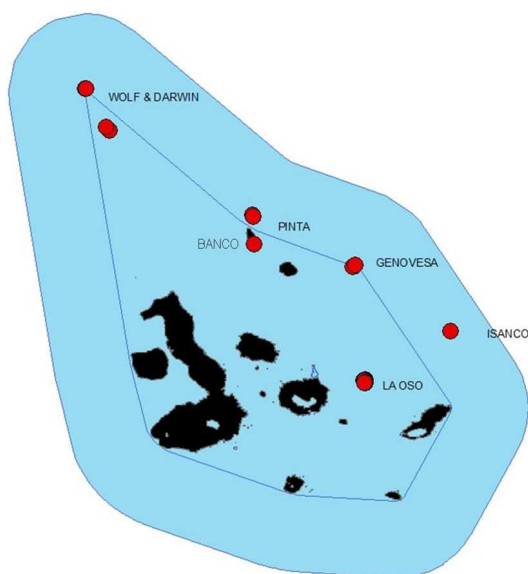


Figure 1: Galápagos Marine Reserve and sample sites. The localities of Wolf & Darwin, Pinta, Banco, Genovesa, Isanco and La Oso. These were then divided into 3 zones: North West (Wolf & Darwin), Central (Pinta, Banco and Genovesa) and South East (La Oso and Isanco)

Localities	Locus	Number of alleles (NA)	Number of private alleles (NP)	Private alleles (frecuencias)
Wolf & Darwin	RHCA007	7	1	31 (0.045)
	RHGATA015	10	1	26 (0.024)
	RHGATA035	4	1	14 (0.024)
	RHGATA076	12	2	30 (0.024)
	RHGATA118	3	1	31 (0.024)
Banco	RHGATA035	4	1	10 (0.200)
	RHGATA076	6	1	22 (0.125)
	RHGATA133	6	1	29 (0.100)
Pinta	RHCA007	4	1	12 (0.045)
	RHGATA032	8	2	10 (0.045)
	RHGATA035	4	1	24 (0.045)
	RHGATA053	8	2	11 (0.045)
	RHGATA065	5	1	7 (0.045)
	RHGATA067	4	1	21 (0.045)
	RHGATA076	9	1	16 (0.091)
	RHGATA133	8	2	17 (0.091)
Genovesa	RHGATA118	4	1	33 (0.045)
	RHGATA133	8	2	10 (0.045)
La Osa	RHCA007	6	1	24 (0.045)
	RHGATA015	8	1	16 (0.025)
	RHGATA032	8	1	14 (0.025)
	RHGATA053	8	1	11 (0.031)
	RHGATA076	11	1	11 (0.031)
	RHGATA133	9	2	29 (0.036)
				14 (0.033)
				21 (0.033)

Table 2: Summary of Private alleles by localities

follows: 25 ng DNA, 1X green PCR buffer, 200 μ M each dNTP's, 2 μ M MgCl₂, 1 μ g/ μ l bovine serum albumin (BSA), 0.3 μ M each primer and 0.72 units Taq DNA polymerase (Go Flexi Taq - Promega). The touchdown PCR program consisted of an initial cycle at 95°C for five minutes, then 20 cycles: of 92°C for 30 seconds, 65°C with a 1°C decrease per cycle for 30 seconds and 65°C for 60 seconds; followed by 39 cycles of 92°C for 30 seconds, 45°C for 30 seconds, and 70°C for 60 seconds, then finally one cycle of 72°C for 7 minutes.

Polymorphisms were visualized on denaturing gels (6% polyacrylamide-5M urea). The electrophoresis was performed in CBS Scientific dual adjustable height sequencing vertical electrophoresis chambers. The gels were developed using the silver staining technique [29, 30]. The molecular weight (MW) and number of tandem repeats data were calculated using "Gene Profiler ver 4.05" from Scanalytics [31].

Statistical Analyses

The data extracted from Gene Profiler was analyzed using GeneALEX 6.41 [32], and Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer 2010) to determine allele frequencies, unique or private alleles, fixation index, heterozygosity, allelic richness, Hardy Weinberg equilibrium, AMOVA and population structure [33–37].

Social Impact

Through informal surveys I investigated about historical fishing: approximately how many "mero" or *H. mystacinus* were fished, how big they were, and why has the fishing tendency moved from the *M. olfax* to *H. mystacinus*. These informal surveys were conducted in both the Galapagos Archipelago and in fishing towns throughout the mainland. Informal surveys were conducted with 28 local fishermen regarding their fishing tendencies. They were asked what species they used to fish more, either *Mycteroperca olfax* (Galapagos grouper, locally known as the Galapagos bacalao) or *H. mystacinus* (Galapagos grouper, known locally as mero); how much of it they used to fish compared to now (high levels, medium levels or low levels); have they changed species; if they did change species, why they changed species; have they noticed a change in the size of fish they are catching.

Results

Genetic Diversity

Allelic frequencies are shown in Figure 2. Figure 2 locus RHGATA076 is the locus with greatest number of

	N	L	PL	A	Ho	He	GD(NEI 78)
Wolf&Darwin	23	12	5	6.167	0.60712	0.64652	0.634
Banco	6	12	3	4.364	0.49242	0.71074	0.823232
Pinta	11	12	11	5.167	0.61136	0.6597	0.662731
Genovesa	24	12	2	5.75	0.55289	0.64274	0.614805
Isanco	4	12	9	3	0.542	0.665	0.694
La-Oso	20	12	2	5.667	0.6112	0.6942	0.7506

Table 3: Summary of the Analysis at the Inter Population Level; number of Polymorphic Loci (PL), mean number of alleles (A), Observed Heterozygosity (Ho), Expected Heterozygosity (He) and Genetic Diversity (GD Nei 78) at 12 microsatellite loci for the 6 Local Populations of *Hyporthodus mystacinus*. Where N = sample size and L = number of loci analyzed.

Locality	Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif
Wolf & Darwin	RHCA007	21	75.715	0.000	***
Wolf & Darwin	RHGATA015	45	68.169	0.014	*
Wolf & Darwin	RHGATA065	15	25.268	0.046	*
Banco	RHCA007	3	10.000	0.019	*
Pinta	RHCA002	3	10.877	0.012	*
Pinta	RHGATA67	3	11.343	0.010	*
Pinta	RHGATA118	3	11.108	0.011	*
Genovesa	RHCA002	3	10.514	0.015	*
Genovesa	RHCA007	10	74.669	0.000	***
Genovesa	RHGATA118	6	27.141	0.000	***
La Oso	RHCA007	15	44.722	0.000	***

Table 4: Significant heterozygote deficiencies of each locality

alleles (18 different alleles) also known as the locus with the greatest allelic diversity.

Figures 2 locus RHGATA015, RHGATA032, RHGATA053, and RHGATA133 also have a great allelic diversity ranging from 11 to 13 different alleles each. Figure 2 locus RHCA002, RHGATA067, and RHGATA 106 have the lowest allelic diversity with only 3 alleles. In Figure 2 locus RHCA002, allele 10 occurs in very low frequencies in the Wolf & Darwin locality, and allele 16 is about to become fixed. Throughout Figure 2 locus RHCA002 we can observe that allele 16 appears in greater frequencies in all of the local populations. In Figure 2 locus RHGATA067, allele 10 is most frequent in all of the local populations, and allele 17 is only observed in the Pinta locality. In Figure 2 locus RHGATA106, allele 31 appears in very low frequencies in the Banco and Isanco localities and will more than likely soon be lost in the other local populations for its frequency is very low; the other two alleles (10 and 22) have similar frequency rates. In Figure 2 RHGATA065, allele 12 appears with greatest frequency which could eventually lead to the loss of the other alleles present. Figure 2 RHGATA 118, in Banco allele 13 has become fixed while allele 16 has been lost in all of the localities except Genovesa and Pinta, in which it is barely present.

Genetic Structure

Genetic variation between populations was analyzed as the frequency of private alleles. Private alleles were found in all of the localities except for Isanco (Table 2 and Figure 2). Pinta has the greatest amount of private alleles (11 alleles) seen across 8 different loci followed by La Oso with 7 private alleles see in 6 different loci. Wolf & Darwin have 6 private alleles in 5 different loci.

Banco has 3 private alleles over 3 different loci. Genovesa has only 1 private allele. The private alleles which appear in the greatest frequency belong to the Banco locality (Table 2 and Figure 2).

The results of the Analysis at the Inter-Population level can be seen in Table 3. The mean number of alleles per locus varied little across the five localities ranging from 3.00 to 6.17 with the lowest number of alleles per locus being found in Isanco. Pinta shows the greatest number of polymorphic loci (11 alleles), followed closely by Isanco with 9 polymorphic loci. The localities with the lowest polymorphic loci are: La Oso and Genovesa with only 2 polymorphic loci, and Banco with 3 polymorphic loci. Mean observed heterozygosity ranged from 0.49242 to 0.61136 and were similar across locations with the exception of the Banco locality which showed substantially lower heterozygosity (Table 3). Generally, observed heterozygosities (H_o) were only slightly lower than expected heterozygosities (HE),

Source	df	SS	MS	Est. Var.	%
AR	2	741.327	370.664	3.541	1.57%
ALPR	3	659.529	219.843	0	0.65%
AILP	82	22139.57	269.995	70.512	34.33%
WI	88	11349.352	128.97	128.97	63.45%
Total	175	34889.778		203.024	100.00%

Table 5: Summary of AMOVA comparing molecular variance of the 6 local populations within the 3 regions (North West, Central and South East). Among Regions (AR), Among Local Populations within Regions (ALPR), Among Individuals within Local Populations (AILP), with Individuals (WI)

F-Statistics	Value	P(rand >= data)
Fst	0.005	0.271
Fis	0.353	0

Table 6: Global AMOVA FST values

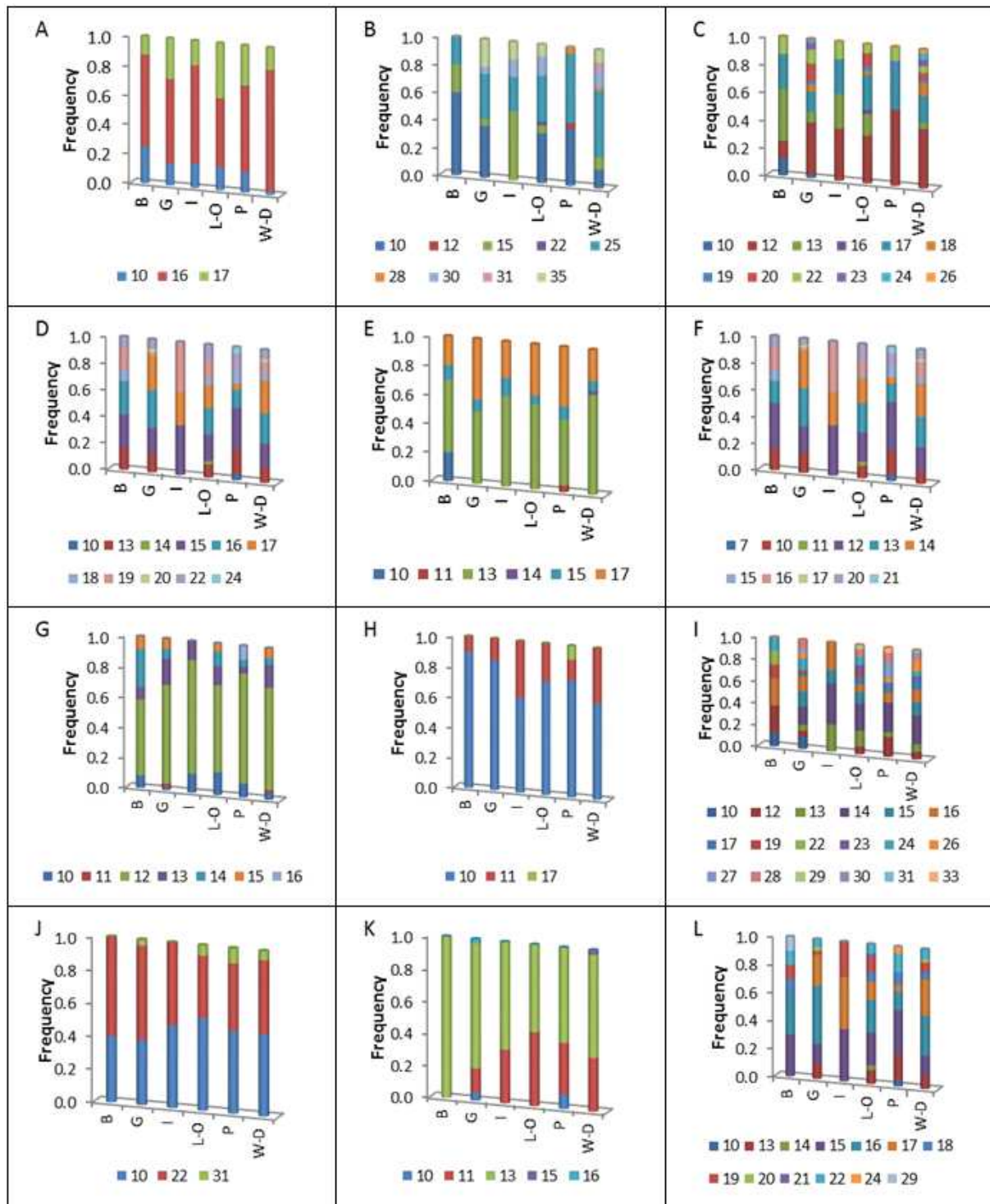


Figure 2: Allele Frequency for Local populations: Banco (B), Genova (G), Isanco (I), La Oso (L-O), Pinta (P), and Wolf & Darwin (W-D). A=Locus RHCA002, B= Locus RHCA007, C = Locus RHGATA015, D = Locus RHGATA032, E = Locus RHGATA035, F = Locus RHGATA053, G = Locus RHGATA065, H = Locus RHGATA067, I = Locus RHGATA076, J = Locus RHGATA106, K = Locus RHGATA118, and L = Locus RHGATA133

with the exception the Banco locality in which the difference was much greater. Banco showed the greatest genetic diversity (0.823232) among the other localities, while Genova had the lowest levels of genetic diversity (0.614805) (Nei 1978)(Table3). Wolf & Darwin locus RHCA007, Genova locus RHCA007, and La Oso locus RHCA007, and Genova locus RHAGATA118 all

have a significant heterozygote deficiencies at $p < 0.001$ (Table 4). Other significant heterozygote deficiencies at $p < 0.05$ were found in the following localities: Wolf & Darwin locus RHGATA015 and RHGATA065; Banco locus RHCA007; Pinta locus RHCA002, RHGATA67, and RHGATA118; and Genova locus RHCA002 (Table 4).

Wolf & Darwin	Banco	Pinta	Genovesa	Isanco	La Oso	
0.000						Wolf & Darwin
0.064	0.000					Banco
0.027	0.054	0.000				Pinta
0.022	0.037	0.024	0.000			Genovesa
0.030	0.077	0.051	0.050	0.000		Isanco
0.018	0.054	0.017	0.019	0.035	0.000	La Oso

Table 7: Summary of Private alleles by localities

Localities	F_{IS}	P value
		Rand $F_{IS} \geq$ Obs F_{IS}
Wolf&Darwin	-0.04043	0.795699
Banco	0.29293	0.047898
Pinta	0.0411	0.423265
Genovesa	-0.16029	0.982405
Isanco	-0.28571	1
La-Oso	0.06912	0.257087

Table 8: Localities specific FIS indices (1023 permutations)

Microsatellite analyses showed low levels of allelic structuring (Table 5 and Figure 3). Only 1.57% of the total microsatellite DNA diversity was explained by the variance among population groups, which means there is very little variation among local populations within regions (ALPR) and among regions (AR) due to great gene flow among the local populations. The largest proportion of variation was explained by the variance among individuals within local populations and even greater variability when comparing each individual. Since there is not a statistically significant variation between localities, the differences may be explained by variation between individuals.

Overall the global AMOVA F_{ST} values of the metapopulation has a genetic differentiation expected under random mating according to the F_{ST} values, but they are not significant ($p > 0.05$; Table 6). Where a F_{ST} value from 0 – 0.05 indicates low genetic differentiation, 0.05 – 0.15 indicates moderate genetic differentiation, 0.15 – 0.25 indicates great genetic differentiation and values above 0.25 indicate very great genetic differentiation. There appears to be a reduction in heterozygosity of an individual due to non-random mating within each population according to the F_{IS} value ($p < 0.001$; Table 6). F_{IS} values range from -1 to 1, in which: negative values or values close to -1 indicate an excess in heterozygosity due to negative assortative mating; positive values or values close to 1 indicate inbreeding or undetected null alleles; values close to 0 are expected under random mating. Pairwise Population F_{ST} Values (Weir and Cockerham 1984) are seen in Table 7. The highest F_{ST} values are seen between the Banco and Isanco localities, while the lowest F_{ST} values are seen between Pinta and La Oso. Of these pairwise populations F_{ST} values, none of them had statistically significant differences among the localities. The localities specific F_{IS} indices show no statistically significant p values (Table 8).

Discussion

High genetic diversity has traditionally been associated with good health of populations, and would signal a good future for traditional fishing of *H. mystacinus*. Therefore, to preserve *H. mystacinus* population at a sustainable level, it is imperative to maintain a high genetic diversity through a good management plan.

H. mystacinus has been found dwelling off of slopes and deep shelf waters (on rocky pinnacles and ledges); based on its deep habitat and apparent constant catches, *H. mystacinus* is currently not experiencing a significant decline. However, it was strongly suggested by grouper experts that continued monitoring is required since little is known of its biology and because it is a target of commercial fishery [1, 4]. According to Matt Craig's report to the IUCN red list, there are no studies on the abundance of *H. mystacinus* [4]. In the eastern Pacific, it is reported to be found from the Galapagos Islands to the Paramount Seamount (north of the Galapagos and west of Columbia and south west of Panama; N 3° 20' 0" W 90° 45' 0") and all the way to coastal Ecuador. However, a preliminary study conducted by Craig (personal communication) has led to the thought that the Eastern Pacific population may be a distinct species from that in the Atlantic.

Little consideration has been given to the genetic composition of populations associated with marine reserves the protected areas category intended to preserve specific species, communities or habitats. In the Galapagos marine reserve, fishing pressures within the reserve, in what could be considered a small closed population, could result in inbreeding and loss of genetic diversity due to overfishing, thus increasing the risk of extinction of these small populations [14]. In this context, genetic information is becoming increasingly important in ecology and conservation biology.

The variance component of genetic diversity at the individual level both within and between individuals suggests no inbreeding or assortative mating within each

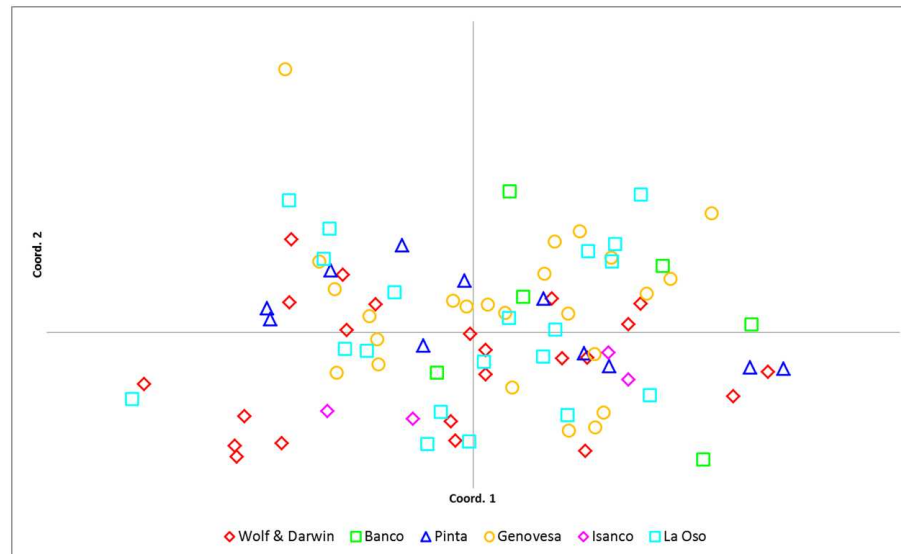


Figure 3: Principal coordinantes analysis (PCoA)

location. Our results suggest great levels of gene flow among the localities, due to the fact that there are no real geographic barriers to separate the individuals from one locality from the next. Also supporting the high levels of global diversity and within local population genetic diversity are the high levels of allelic diversity and high levels of private alleles found within each locality.

The low genetic structuring found is congruent with the high levels of gene flow among localities. The highest level of genetic diversity found in Banco may be due to its central location between all of the other localities which is in agreement with Nei (1978) [33].

These high levels of genetic diversity suggest a healthy population as well as high population connectivity within the Galapagos;. The highest levels of diversity are found within individuals and therefore among local populations (63.45% and 34.33% respectively), yet due to the great level of gene flow among local populations of localities, there is a low genetic differentiation among local populations and within regions (0.65% and 1.57% respectively). Nonetheless, precautions must be taken in order to preserve these high levels of heterozygosity, genetic diversity and gene flow among the localities of the Galapagos Marine Reserve. One of the reasons why there are such high levels of diversity within individuals and such low levels among regions is because of the high levels of gene flow among localities which also explains the high levels of heterozygosity. In order to maintain these high levels of genetic diversity, gene flow among localities must be maintained.

Historically, the Galapagos Islands fisheries have been focused on the *M. olfax*, but in recent years the trend has moved to a fishery focused on the *H. mystacinus*. According to local fishermen, the switch occurred because they can no longer fish *M. olfax*, in the abundance that they used to. Its population started to decline with overfishing (due to its demand) and the remaining

population is now found in deeper waters, which gave the fishermen no other choice but to switch to another fish. The information provided by the fisherman was confirmed by the Galapagos Marine Reserve (GMR) report by Murillo et al [27] and Molina et al [28] since the coastal species of grouper demersal fish are decreasing (specifically *M. olfax*), people are increasingly relying on species of demersal fish found in the seamounts (“bajos” in Spanish) such as the *H. mystacinus*. Also the amount of *H. mystacinus* being caught is greater now, not because the population has increased but because there is now a greater focus on this species. The information given by the local fishermen are supported by the reports from the Galapagos National Park (GNP), monitoring of fish landings from 2003 which show that the most predominant species fished was the *H. mystacinus* [28]. In 2003, *H. mystacinus* fisheries alone represented 95.4 tons, which is 25% of all fisheries (Murillo et al. 2003, Molina et al. 2004). This surpassed by far the *M. olfax*, which only had 59.7 tons, making *H. mystacinus* the most economically valuable fish in that year (Molina et al. 2004). This could mean that if no precautions are taken, the *H. mystacinus* could follow the path of the endemic *M. olfax*. It must be noted that older and younger generations of fishermen are familiar with the concept of the shifting baseline (also known as sliding baseline) in which the current generation of fishermen think that the “normal” size of fisheries is much smaller than that of previous generations [38]. This is very important when it comes to conservation of the species.

As a member of the Serranidae family, the *H. mystacinus* is a hermaphrodite, more specifically a protogynous hermaphrodite, which means that the individuals change sex from females to a few dominant males (Nelson 1994). According to the local fishermen females are the smaller ones and live in much shallower waters. In Isla de la Plata, part of Machalilla National Park in mainland Ecuador, *H. mystacinus* has been ob-

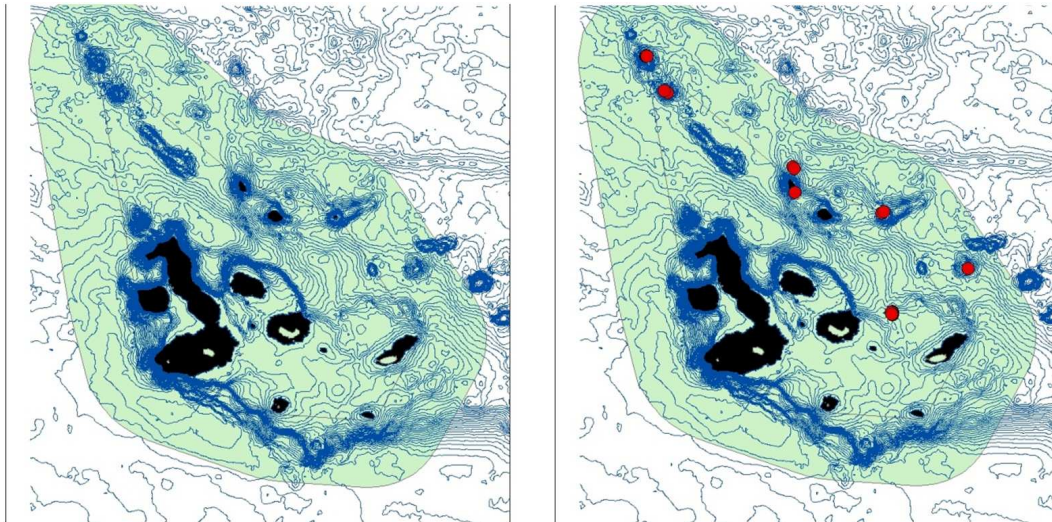


Figure 4: Bathymetry map indicating seamounts and sites where samples were taken. Map on the left only indicates contour lines of bathymetry. Map on the right indicates with a red dot where samples were collected. Sample site match seamount locations

Family	Scientific Name	Local Name	1997	1998	1999	2000	2001	2002
Serranidae	<i>M. olfax</i>	Bacalao	118	145	92	45	61.5	30
Serranidae	<i>H. mystacinus</i>	Mero	31	18	10	1.2	25.8	41.6

Table 9: Table adapted from Murillo et al. 2003. [27] Quantity in tonnes of Bacalao and Mero caught during 1997 until 2002.

served and photographed at depth of only 15 meters, with sizes ranging from 40-60 cm. The *H. mystacinus* being caught commercially in Galapagos is said to be the male of the species and is caught at depth of 140-200 meters and with lengths up to 135 cm. This means that all the samples from Galapagos used in my study were taken off of large males. If all of the larger males are being caught, then how will the smaller females be fertilized? Not enough is known about *H. mystacinus* about when or what causes the sex change to occur, therefore, if all of the males of the species are being extracted from the metapopulation, it could have serious effects on the population size. The fact that they are protogynous hermaphrodites also implies the need for special management of the species with regards to the allowable size to be caught. Furthermore, a study revealed that among the females, older individuals of some fish species produce larvae that have substantially better survival potential than do larvae from younger fishes [39]. If this were applied to *H. mystacinus*, this could mean that the larger females are more important in producing viable offspring than the smaller ones. The combination of these two factors, their hermaphroditic characteristic and the more optimal production of the larger individuals which usually tend to have exponentially greater fecundity is important since commercial and traditional fisheries often target the larger fish. The protection of larger or older individuals is necessary for the sustainability of species currently exploited by humans [39].

As for conservation of the species, ideally, considering that the local fishermen are fishing within a marine reserve, the Galapagos Marine Reserve (GMR), the Galapagos National Park (GNP) should only allow fishing for local consumption and not for exportation to the

main land or international consumption. But due to the fact that this is the fishermen's livelihood, other conservation efforts could be taken into consideration.

Genetic diversity has been shown to be directly correlated with the species fitness and population size [17, 23, 40]. If no proper management steps are taken, more than likely we will see a collapse of the *H. mystacinus* fisheries within the GMR as has been seen worldwide in other fisheries [11, 39, 41]. According to the 2006-2007 Galapagos Report, marine resources including *M. olfax*, have declined precipitously over the years [42]. In fact in 2007 the IUCN considered *M. olfax* to be a vulnerable species (VU) [42]. Overall the amount in tones fished of *M. olfax* is steadily decreasing, while amount in tones of *H. mystacinus* is generally increasing (see Table 9) [27].

An alternative would be to set aside no take zones on seamounts where Serranidae are usually found. Connectivity between all of the localities will likely maintain levels of genetic diversity, heterozygosity and gene flow in spite of an overfishing of local populations at seamounts. The *H. mystacinus* is considered to be a metapopulation in Galapagos, which means that each one of the localities has the possibility of going extinct. The optimal harvest regime depends on the endogenous source-sink dynamics, which are determined by differences in population levels across space, as well as on the biological mechanisms acting on dispersal [43]. Therefore the key to understanding the optimal management of marine species is knowledge of dispersal and gene-flow [44, 45]. It must first be determined where the source of this metapopulation is located and where the sink is located, and in order to accomplish this, fur-

ther research is needed on the mainland. Taking current into account, we could assume that the mainland could be the source of the Galapagos metapopulation, but since there is no evidence of this yet, I therefore would suggest for the GMR to either set aside some of the seamounts as no take zones in which all fishing is prohibited or to set a maximum amount of fish that can be taken from any one of these seamounts in order to prevent depletion or overfishing of the species, as was the case with the endemic *M. olfax*. Another option would be to rotate the no take seamounts on a yearly basis; i.e. in one year allow fishing in the Banco locality and setting the Isanco locality as no take zone and the following year reversing them. With each passing year, *H. mystacinus* fisheries are becoming more important commercially to the local economy in the Galapagos Islands. The Galapagos' white fishery includes the exploitation of different demersal and coastal pelagic fish species (68 species) with the groupers family being the most important [27, 28]. There are no recent estimates of the state of this fishery, but it is thought that the resource could be overexploited [27, 28]. Since the coastal species of grouper are decreasing (specifically *M. olfax*), people are increasingly relying on species of demersal fish found in the seamounts or "bajos") such as the *H. mystacinus* [27, 28]. According to reports from the Galapagos National Park (GNP), monitoring of fish landings from 2003 shows that the most predominant species fished was the *H. mystacinus* [28]. In 2003, *H. mystacinus* fisheries alone represented 95.4 tons, which is 25% of all fisheries. This surpassed by far the *M. olfax*, which only had 59.7 tons, making *H. mystacinus* the most economically valuable fish in that year [28].

It is important to conserve genetic diversity since it provides the raw material for the maintenance of species over longer evolutionary time-scales, and is also of particular relevance at present in terms of providing the basis for responses to rapid environmental change (e.g. climate), since reduced genetic diversity has been correlated with decreased fitness [41, 46].

Acknowledgments

This research was funded in part by Rufford Small Grants for Conservation (10574-1), and the Galapagos Academic Institute for the Arts and Sciences (GAIAS). Many thanks to the local fishermen who made this study possible: Marco Escarabay and Vicente Becerra. Thanks to the Galapagos National Park Staff Juan Carlos Murillo. Great appreciation and thanks to: Dr. Franklin Perez and One Lab Staff for without them the genetic analysis would nothave ben posible; Matthew Craigg for advising and guiding this research; and Ines Sabando for helping with lodging and food during the field work. Most of all, many thanks to God, my dogs and my family, my mom Cyndy Leoro and my husband Mario Israel Riofrio for their never ending support.

References

- [1] GWSG. 2007. "Workshop for Global Red List: Assessments of Groupers. Family Serranidae; subfamily Epinephelinae". *Groupers and Wrasses Specialist Group*.
- [2] Nelson, J. 1994. "Fishes of the World". *Fishbase, Third edition*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- [3] Craig, M.; Hastings, P. 2007. "A molecular phylogeny of the groupers of the subfamily Ephinephelinae (Serranidae) with a revised classification of the Epinephelini". *Ichthyological Research*, 54:1 – 17.
- [4] Rocha, L.; Ferreira, B.; Choat, J.; Craig, M.; Sandovy, Y. 2008. "Epinephelus mystacinus". *IUCN 2010. in IUCN Red List of Threatened Species*.
- [5] Heemstra, P.; Randall, J. 1993. "Groupers of the world (Family Serranidae, Subfamily Ephinephelinae). An annotated and illustrated catalogue of the grouper, rockcod hind, coral grouper and lyretail species known to date". *FAO species catalogue*, 16.
- [6] Craig, M.; Graham, R.; Torres, R.; Hyde, J.; Freitas, M.; Ferreira, B.; Hostim-Silva, M.; Gerhardinger, L.; Bertoncini, A.; Robertson, D. 2009. "How many species of goliath grouper are there? Cryptic genetic divergence in a threatened marine fish and theresurrection of a geopolitical species". *Endangered Species Research*, 7:167 – 174.
- [7] Ramirez, M.; Acevedo, J.; Planas, S.; Carlin, J.; Funk, S.; McMillan, O. 2006. "New Microsatellite resources for groupers (serranidae)". *Molecular Ecology*, 6(813 – 817).
- [8] Toro, M.; Caballero, A. 2005. "Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations". *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 360:1367 – 1378.
- [9] Lande, R. 1982. "A Quantitative Genetic Theory of Life History Evolution". *Ecology*, 63(607 – 615).
- [10] Polans, N.; Allard, R. 1989. "An experimental evaluation of the recovery potential of ryegrass populations for genetic stress resulting from restriction of population size". *Evolution*, 43:1320 – 1324.
- [11] Caro, T.; Lareson, M. 1994. "Ecological and Genetic Factors in Conservation: A Cautionary Tale.". *Science*, 263:485 – 486.
- [12] Amos, W.; Harwood, J. 1998. "Factors Affecting Levels of Genetic Diversity in Natural Populations.". *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 353:177 – 186.
- [13] Lande, R. 1998. "Demographic Stochasticity and Allele Effect on a Scale with Isotropic Noise". *Oikos*, 83:353 – 358.
- [14] Blomqvist, D.; Pauliny, A.; Larsson, M.; Flodin, L. 2010. "Trapped in the extinction vortex? Strong genetic effects in a declining vertebrate population". *BMC Evolutionary Biology*, 10:1 – 9.

- [15] Lande, R. 1976. "Natural Selection and Random Genetic Drift in Phenotypic Evolution". *Evolution*, 30(314 - 334).
- [16] Lande, R. 1993. "Risks of Populations Extinction from Demographic and Environmental Stochasticity and Random Catastrophes". *The American Naturalist*, 142:911 - 927.
- [17] Lande, R. 1994. "Risk of Population Extinction from Fixation of New Deleterious Mutations". *Evolution*, 48: 1460 - 1469.
- [18] Skaug, H. 2001. "Allele-Sharing Methods for Estimation of Population Size". *Biometrics*, 57:750 - 756.
- [19] Hastings, A.; Harrison, S. 1994. "Metapopulation dynamics and genetics". *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 25(167 - 188).
- [20] Cowen, R.; Lwiza, K.; Sponaugle, S.; Paris, C.; Olson, D. 2000. "Connectivity of Marine Populations: open or close". *Science*, 287:857 - 859.
- [21] Cowen, R. 2002. "Larval dispersal and retention and consequences for population connectivity. in Dynamics and Diversity in a complex Ecosystem". *Academic Press, San Diego*.
- [22] Gilg, M.; Hilbish, T. 2003. "The geography of marine larval dispersal: coupling of genetics with fine-scale physical oceanography". *Ecology*, 84:2989 - 2998.
- [23] Hauser, L.; Adcock, G.; Smith, P.; Ramirez, H.; Carvalho, G. 2002. "Loss of microsatellite diversity and low effective population size in overexploited population of New Zealand snapper (*Pargus auratus*)". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:11742 - 11747.
- [24] Brown, W. 1983. "Diversity and Genetic Vulnerability: An Appraisal". *Springer on behalf of New York Botanical Garden Press. Economic Botany*, 37:4 - 12.
- [25] Worm, B.; Hilborn, R.; Baum, J.; Branch, T.; Collie, J.; Costello, C.; Fogarty, M.; Fulton, E.; Hutchings, J.; Jennings, S.; Jensen, O.; Lotze, H.; Mace, P.; McClanahan, T.; Minto, C.; Palumbi, S.; Parma, A.; Ricard, D.; Rosenberg, A.; Watson, R.; Zeller, D. 2009. "Rebuilding Global Fisheries". *Science*, 325:578 - 585.
- [26] Martins, W. S.; Lucas, D.; Neves, K.; Bertoli, D. 2009. "A Web Software for MicroSatellite Marker Development". *Bioinformatics*, 3(6):282 - 283.
- [27] Murillo, J.; Chasiluisa, C.; Molina, L.; Moreno, J.; Andrade, R. 2003. "Pesca blanca y pesquerías que duran todo el año en Galápagos, 2002. In: Evaluación de las pesquerías en la Reserva Marina de Galápagos. Informe Compendio 2002". *Fundación Charles Darwin y Servicio Parque Nacional Galápagos, Santa Cruz, Galápagos, Ecuador.*, : 97 - 124.
- [28] Molina, L.; Chasiluisa, C.; Murillo, J.; Moreno, J.; Nicolaidis, F.; Barreno, J.; Vera, M.; Bautil, B. 2004. "Pesca blanca y pesquerías durante todo el año, 2003". *Fundación Charles Darwin y Dirección Parque Nacional Galápagos, Santa Cruz, Galápagos, Ecuador*.
- [29] Benbousa, H.; Jacquemin, J.; Baudoin, J.; Mergeai, G. 2006. "Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels". *Biotechnologie, Agronomie Société et Environnement*, 10:77 - 81.
- [30] Creste, S.; Tulmann-Neto, A.; Figueira, A. 2001. "Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining". *Plant Molecular Biology Reporter*, 19:299 - 306.
- [31] Scanalytics Inc. 2011. "Gene Profiler 4.0.5 software".
- [32] Peakall, R.; Smouse, P. 2006. "GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research". *Molecular Ecology Notes*, 6:288 - 295.
- [33] Nei, M. 1978. "Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals". *Genetics*, 89:583 - 590.
- [34] Slatkin, M. 1985. "Gene Flow in Natural Populations". *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16:393 - 430.
- [35] Frankham, R.; Ballou, J.; Briscoe, D. 2002. "Introduction to Conservation Genetics". *Cambridge University Press, Cambridge UK*.
- [36] Hanski, I.; Gaggiotti, O. 2004. "Ecology, Genetics, and Evolution of Metapopulations". *Elsevier Academic Press, New York*.
- [37] Freeland, J. 2005. "Molecular Ecology". *John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex PO19 8SQ, England*.
- [38] Pauly, D. 1995. "Anecdotes and the shifting baseline syndrome of fisheries". *Trends in Ecology and Evolution*, 10:430.
- [39] Birkeland, C.; Dayton, P. 2005. "The importance in Fishery management of leaving the big ones". *Trends in Ecology and Evolution*, 20:356 - 358.
- [40] Reed, D.; Frankham, R. 2003. "Correlation between Fitness and Genetic Diversity". *Conservation Biology*, 17:230 - 237.
- [41] Bell, J.; Okamura, B. 2005. "Low Genetic Diversity in a Marine Nature Reserve: Re-Evaluating Diversity Criteria in Reserve Design". *Proceedings: Biological Sciences*, 272:1067 - 1074.
- [42] Parque Nacional Galápagos. 2007. "Galapagos Report 2006-2007". *Estación Científica Charles Darwin*.
- [43] Sanchirico, J.; Malvadkar, U. 2005. "No-take Zones as Optimal Fishery Management". *NOAA*.
- [44] Gerber, L.; Botsford, L.; Hastings, A.; Possingham, H.; Gaines, S.; Palumbi, S.; Andelman, S. 2003. "Population models for marine reserve design: A retrospective and prospective synthesis". *Ecol. Appl.*, 13(S47 - S64).
- [45] Guichard, F.; Levin, S.; Hastings, A.; Siegel, D. 2004. "Toward a Dynamic Metacommunity Approach to Marine Reserve Theory". *Bioscience*, 54(11):1003 - 1011.

- [46] Hoelzel, A.; Fleischer, R.; Campagna, C.; Boeuf, B.; G., A. 2002. "Impact of a population bottleneck on symmetry and genetic diversity in the northern elephant seal". *Journal of Evolutionary Biology*, 15:567 – 575.

Construcción de bacmids recombinantes con genes inmunogénicos del virus de la fiebre aftosa usando el sistema Bac-to-Bac

Paulina Andrade^{1*} y Daniel Palacios¹

¹Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales. Laboratorio de Biología Molecular. Diego de Robles y Vía Interoceánica, Campus Cumbayá, Edif. Darwin. Casilla Postal 17-1200-841, Quito, Ecuador.

*Autor principal/Corresponding author, e-mail: pandrade@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: Cesar Zambrano, Ph.D.

Recibido/Received: 16/05/2013. Aceptado/Accepted: 26/05/2013.

Publicado en línea/Published on Web: 28/06/2013. Impreso/Printed: 06/06/2013.

Abstract

The Foot and Mouth disease virus belongs to the Picornavirus family and primarily affects to bovine, ovine, porcine and caprine. The virus is divided in seven serotypes, O, A, C, Sat1, Sat2, Sat3 and Asia1. In Latin America, the most prevalent serotypes are O and A, in Ecuador, serotype O is the most common. Currently, the vaccine in use is that of an inactivated virus that has some disadvantages such as a limited immune response, the need for a cold chain to keep the vaccine functional and the need of a great quantity of virus to manufacture it. An alternative to overcome these inactivated vaccine's problems is the creation of subunit vaccines using a recombinant protein expression system, where only the immunogenic components of the pathogen are used. Therefore, this project's main objective is the application of a Bac-to-Bac system for the construction of recombinant baculovirus with the foot and mouth disease virus' highly immunogenic capsid genes such as VP1, P1-2A and 3C from serotype O. Recombinant baculoviruses were obtained with the VP1 construct and these will be later transfected in insect cells for the expression and analysis of VP1 as a possible candidate for a subunit vaccine.

Keywords. Foot and mouth disease virus, Serotype O, Baculovirus, VP1 gene, subunit vaccine, Bac to Bac.

Resumen

El virus de la fiebre aftosa pertenece a la familia de los Picornavirus y afecta mayormente a animales bovinos, ovinos, porcinos y caprinos. Se divide en 7 serotipos: O, A, C, Sat1, Sat2, Sat3 y Asia1. En Latinoamérica, los serotipos más prevalentes son el O y A, en Ecuador, el serotipo de mayor incidencia es el O. La vacuna que se utiliza actualmente es una vacuna convencional de virus inactivado que posee algunas desventajas como una respuesta inmune limitada, la necesidad de una cadena de frío para mantener a la vacuna viable y el requerimiento de grandes cantidades de virus para fabricarla. Una alternativa para superar estos problemas y en general los problemas de las vacunas convencionales, es la creación de subunidades de vacunas por medio de un sistema de expresión de proteínas recombinantes, donde se utiliza sólo las proteínas inmunogénicas del patógeno. Por lo tanto, este proyecto se centró en la aplicación del sistema Bac-to-Bac para la construcción de baculovirus recombinantes con genes de la cápside, altamente inmunogénicos, del virus de la fiebre aftosa como son VP1, P1-2A y 3C del serotipo O. Se logró obtener baculovirus recombinantes con el constructo VP1 y éstos, posteriormente, serán transfectados en células de insectos para la expresión y análisis de VP1 como un posible candidato de subunidad de vacuna.

Palabras Clave. Virus de fiebre aftosa, Serotipo O, Baculovirus, gen VP1, subunidades de vacuna, Bac to Bac.

Introducción

La fiebre aftosa (FA) es un virus de ARN de sentido positivo perteneciente a la familia de los *Picornaviridae* del género de los *aphtovirus*. Su ARN codifica para una sola poliproteína que contiene los genes estructurales y los genes no estructurales del virus. La cápside está forma-

da por las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4, las cuales son codificadas por la región P1 del genoma. La región P2 y P3 del genoma codifican para las proteasas 2A y 3C y las proteínas encargadas de la replicación del virus, 2B, 3A, 3B, 3D. Para el procesamiento de la poliproteína viral es necesaria la actividad de las proteasas 2A y 3C, las cuales cortan la poliproteína y

ISSN 1390-5384



Primer	Secuencia	Descripción
P1-2A (F)	ATAGGATCCaccatgGGACAATCCAGTCCAGCGAC	Extra-BAMHI-Kozak-Start-P12A
P1-2A (R)	CGCGAATTCTtaCCCAGGGTTGGACTCAACGT	Extra-ECORI-Stop-2A
3C (F)	ATAGAATTCaccatgAGTGGTGCCCCACCGACCG	Extra-ECORI-Kozak-start-3C
3C (R)	CGCAAGCTTttaTCGTGGTGTGGTTCCGGGGTC	Extra-HINDIII-stop-3C
VP1 (F)	ATAGGATCCaccatgAACCCTTCTGCGGGCGAGT	Extra-BAMHI-Kozak-start-VP1
VP1 (R)	CGCAAGCTTttaAAGTCTGTTTCACCGGTGCCAC	Extra-HINDIII-stop

Tabla 1: Primers utilizados para la amplificación de los genes inmunogénicos de la FA

ensamblan la cápside viral respectivamente [1].

El virus de la FA genera una enfermedad que afecta mayormente a animales bovinos, ovinos, caprinos y porcinos y está dividida en 7 serotipos: A, O, C, Sat1, Sat2, Sat3 y Asia 1; dentro de los cuales los serotipos A y O son los que están presentes en Latinoamérica.

La transmisión del virus ocurre por aerosoles y una vez que ingresa en el animal, se replica primero en la faringe por 24-48 horas. Posterior a su replicación, el virus invade el torrente sanguíneo y en corto tiempo aparecen las lesiones características en la boca y en las patas de los animales susceptibles [2]. Los síntomas de la enfermedad son fiebre, anorexia, depresión y baja producción de leche y debido a las lesiones en la boca y patas, ocasiona salivación excesiva y cojera [3]. La viremia usualmente desaparece después de 3-4 días pero el virus se replica, altamente, en los sitios donde ocurren las lesiones (>8 log 10 unidades infecciosas por mL), a través de las cuales ocurre el contagio hacia otros animales [1, 2].

En el Ecuador, esta enfermedad constituye un gran problema económico debido a que las pérdidas del sector ganadero alcanzan hasta los \$25 millones anuales y al parecer, hasta el día de hoy, la erradicación no ha sido positiva [4]. Uno de los problemas por el cual no se ha dado esta erradicación se debe a que no siempre se manejan planes de vacunación efectivos por parte del sector ganadero. Adicionalmente, la vacuna de virus inactivado, utilizada actualmente, presenta problemas de estabilidad ya que el ARN del virus es termolábil y, por lo tanto, la vacuna requiere de un riguroso manejo de su cadena de frío, el cual no siempre se lo logra. Su producción también es compleja y muy pocos países fabrican la vacuna, de virus inactivado, ya que genera problemas de bioseguridad por la necesidad de cultivar al virus de forma masiva [6].

Una posible solución a los problemas que tiene la vacuna de virus inactivado para la FA es la creación de subunidades de vacunas, las cuales tienen como componente principal las proteínas inmunogénicas del patógeno por lo que no presentan problemas de bioseguridad y son más estables a los cambios de temperatura [6]. En la actualidad, un sistema altamente utilizado para la creación de subunidades de vacunas es el sistema Bac to Bac, el cual emplea el baculovirus *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) que tiene un genoma de 133 kilobases. Este baculovirus ha sido modificado (bacmid) para la expresión de genes foráneos en cultivo de células de insecto o larvas [6]. El sistema Bac

to Bac utiliza el mecanismo del transposón Tn7 para la transposición de un cassette de expresión, contenido dentro un plásmido donante, al vector bacmid. En este sistema, los bacmids recombinantes son generados en *Escherichia coli* y luego son utilizados para transfectar células de insecto y expresar las proteínas recombinantes [6].

Los genes del virus de la FA con potencial inmunogénico para ser posibles subcandidatos de vacuna son los de su cápside [5]. Por lo tanto, esta investigación plantea crear bacmids recombinantes que contengan estos genes inmunogénicos de la FA, mediante la amplificación y clonación de VP1, P1-2A y P1-2A-3C dentro del sistema Bac to Bac.

Métodos

Confirmación molecular de la presencia del virus de la fiebre aftosa en muestras epiteliales

Cinco muestras de epitelio de lengua de ganado vacuno síntomas de fiebre aftosa, fueron donadas por el Instituto de Zoonosis del Instituto Nacional de Higiene (INH). A partir de estas muestras se extrajo el ARN total utilizando el kit EZNA total RNA kit I (Omega Bio-Tek). La confirmación de la presencia del virus se realizó mediante RT-PCR utilizando el SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity de invitrogen. Los primers fueron obtenidos del Manual de Fiebre Aftosa de Malirat y Bergmann [7] correspondientes al serotipo O. El programa de RT-PCR consistió en la retrotranscripción a 55°C por 30 minutos, seguido de una PCR con 35 ciclos de denaturación a 94°C por 1 minuto, annealing a 60°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 2 minutos y una extensión final de 72°C por 5 minutos.

Amplificación de los genes inmunogénicos de la FA

Para la amplificación de los genes inmunogénicos VP1, P1-2A y 3C, se diseñaron primers específicos en base a la secuencia de estos genes obtenida a través del GenBank. Posteriormente, se utilizó el programa de Primer Blast del NCBI para escoger la secuencia de los primers, los cuales se seleccionaron en base a la longitud, temperatura de annealing y porcentaje de citosinas y guaninas. Además, se incluyeron sitios de restricción para la clonación de los genes dentro del plásmido pFastBac, nucleótidos extra para mejorar la eficiencia de la restricción enzimática [8], codones de inicio y fin y una

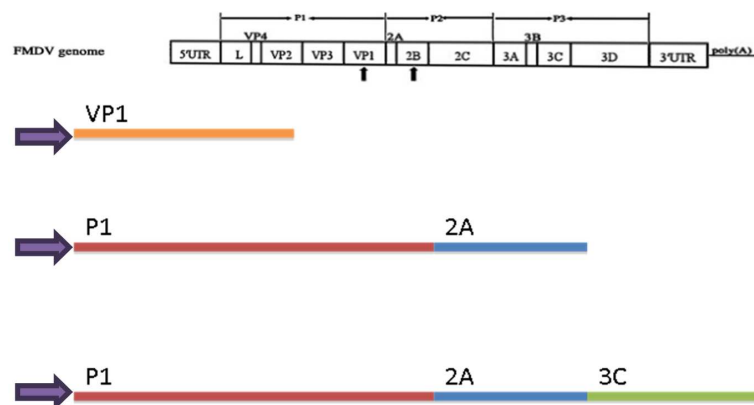


Figura 1: Esquema de constructos que se utilizaron en este proyecto. VP1, P1-2A y P1-2A-3C. Figura modificada de Sáiz et al. [5].

secuencia Kozak para mejorar la eficiencia de la traducción (tabla 1).

La amplificación de los genes, se realizó mediante RT-PCR a partir del ARN extraído de las muestras positivas para el serotipo O. Las condiciones del RT-PCR fueron las siguientes: para los genes VP1 y 3C, 55°C por 30 minutos para la retrotranscripción, seguido de 35 ciclos de denaturación a 95°C por 2 minutos, 60°C por 15 segundos y 55°C por 15 segundos de temperatura de annealing, 72°C por 2.5 minutos de elongación y una extensión final a 72°C por 5 minutos. El programa de RT-PCR para el gen P1-2A fue de 55°C por 30 minutos para la retrotranscripción, seguido de 35 ciclos de denaturación a 95°C por 2 minutos, 67°C por 15 segundos y 65°C por 15 segundos de temperatura de annealing más 72°C por 2.5 minutos de elongación y una extensión final a 72°C por 5 minutos. Se empleó el termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400. Los amplicones fueron observados en gel de agarosa al 1 % y purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega.

Creación de constructos

Los constructos propuestos para esta investigación fueron el gen de la cápside viral VP1, el conjunto de genes estructurales P1 más la proteasa 2A (P1-2A) y P1-2A más

la proteasa 3C (Fig.1). Estos constructos fueron clonados en el plásmido donante pFastBac, el cual contiene un cassette de expresión que consiste en un marcador de selección de resistencia a la gentamicina, un promotor específico de baculovirus, un sitio de clonación múltiple, sitios Tn7 para la transposición y una cola poli A del SV40.

Para la clonación se realizó restricción enzimática de los productos de PCR y del plásmido pFastBac utilizando las enzimas de restricción específicas para cada constructo (Tabla 1). Los productos de la restricción enzimática de los genes inmunogénicos fueron visualizados y purificados del gel de agarosa 0.75 %, utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega. El plásmido pFastBac no fue purificado después de la restricción enzimática.

Los productos escindidos y purificados de los genes y del plásmido pFastBac fueron utilizados en un radio de 1:5 (1 parte de vector y 5 partes de inserto) con un mínimo de concentración de plásmido de 50 ng para la ligación. La determinación de este radio se lo realizó mediante la ecuación 1.

$$\frac{ng\ de\ vector \times\ Tama\ de\ inserto\ (pb)}{Tama\ de\ vector} \times\ radio\ molar\ de\ \frac{Inserto}{Vector} = ng\ de\ inserto \tag{1}$$

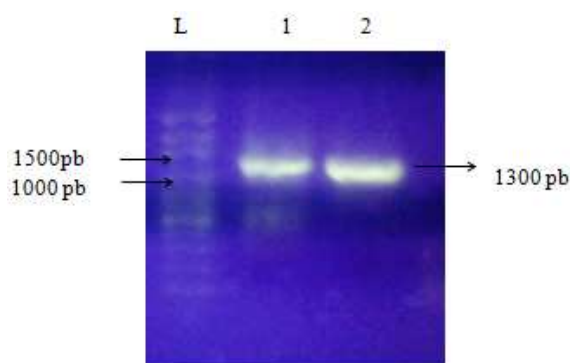


Figura 2: Amplificación del serotipo O del virus de la Fiebre Aftosa de muestras de epitelio de ganado vacuno. L: escalera marca Axygen de 100 pb. 1) Producto de amplificación de la muestra 226 2) Producto de amplificación de la muestra 86.

Células *E. coli* DH10β fueron transformadas con el plásmido ligado, utilizando una solución de CaCl₂ 60 μM y shock térmico. Posteriormente, estas células fueron cultivadas en medio LB suplementado con ampicilina (100 μg/mL), debido a que el marcador de selección del plásmido pFastBac es el gen de la β-lactamasa. Se comprobó identidad del gen clonado mediante secuenciación.

Generación de bacmids recombinantes mediante el sistema Bac to Bac

Se utilizó el sistema Bac to Bac para la generación de bacmids recombinantes. Este sistema consta de células especiales de *E. coli*, llamadas DH10Bac; las cuales contienen el bacmid con gen de resistencia a la kanamicina y un sitio mini-attTn7 insertado en la terminal N

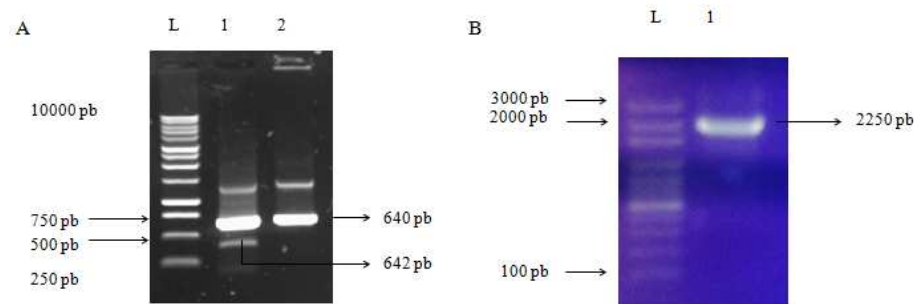


Figura 3: Amplificación de los genes de la cápside de la FA. L: Escalera de 1kb marca Promega. 1) Amplificación de gen VP1. 2) Amplificación del gen 3C. B. Amplificación del gen de la cápside del virus de la fiebre aftosa. L: escalera de axygen de 100 pb hasta 3000 pb. 1) Amplificación del conjunto de genes P1-2A.

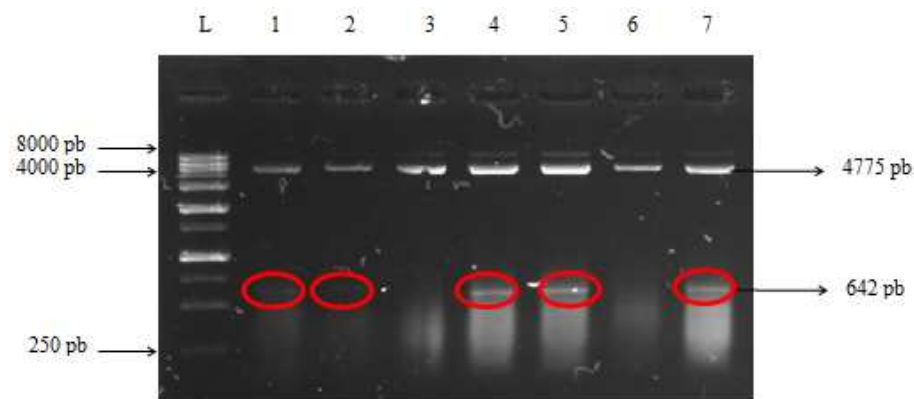


Figura 4: Restricción enzimática del plásmido recombinante pFastBac con BamHI y HindIII para determinar la presencia del gen VP1 dentro del vector. L) Escalera marca axygen de 250 pb. 1 - 7 restricciones enzimáticas de pFastBac-VP1 de colonias positivas.

del gen que codifica para el péptido de *lacZα* que complementa la delección del *lacZ* de las DH10Bac. Así mismo, contienen un plásmido ayudador que codifica para la transposasa del transposón Tn7 y para la resistencia a la tetraciclina. Se indujo la transformación de las células DH10Bac utilizando CaCl_2 60 μM y shock térmico. Posteriormente, se dejó incubar a 37°C con agitación a 225 rpm por 4 horas para que ocurra la transposición del cassette de expresión del pFastBac al bacmid, interrumpiendo el gen *lacZα*. Las bacterias fueron sembradas en un medio LB suplementado con tetraciclina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), gentamicina (7 $\mu\text{g}/\text{mL}$), X-Gal (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e IPTG (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se seleccionaron las bacterias lactosa negativas, se les extrajo el bacmid y se realizó un PCR utilizando primers del inserto para confirmar su presencia.

Resultados y discusiones

La fiebre aftosa es una enfermedad causada por un virus que afecta a la producción de ganado. Existen 7 serotipos del virus y no existe inmunidad cruzada entre los serotipos [9]. Debido a las limitaciones que posee la vacuna de virus inactivado, utilizada para prevenir brotes de FA [10], es necesario buscar alternativas para su prevención. Una opción interesante es el establecer un sistema in vitro de expresión de proteínas inmunogénicas del virus que pueden ser utilizadas como posibles candidatos para el desarrollo de subunidades de vacunas.

Es por esta razón que este trabajo propuso la expresión de proteínas inmunogénicas del virus en el sistema de expresión Bac to Bac, altamente, utilizado para la expresión de antígenos virales [6].

Confirmación molecular de la presencia del virus de la fiebre aftosa en muestras epiteliales

Se logró amplificar el ADN del serotipo O en dos de las cinco muestras de epitelio de ganado vacuno. La banda correspondiente al serotipo es de 1300 pb [7] (Fig. 2).

Amplificación de los genes inmunogénicos de la FA

Se llegó a estandarizar el protocolo de amplificación de los genes estructurales del virus de la fiebre aftosa, a través de la utilización de diferentes temperaturas de annealing. En las siguientes figuras se puede observar la amplificación de los genes VP1 y 3C del serotipo O que tienen un tamaño de 642 y 640 pb, respectivamente, y la amplificación del gen P1-2A que tiene un tamaño de 2250 pb (Fig.3).

Creación de constructos

A partir de la amplificación de estos genes, se logró clonar el VP1 en el vector de pFastBac. Para constatar la presencia del gen VP1 dentro del vector, se realizó la purificación y restricción enzimática de pFastBac-VP1. Como se observa en la Figura 4, esta restricción presentó dos bandas: una correspondiente a pFastBac de 4775 pb y una correspondiente al gen VP1 de 642 pb.



Figura 5: Extracción y PCR del Bacmid para comprobar la presencia del gen VP1. L) Ladder marca Axygen de 250 pb - 8000 pb. 1-5) extracciones de Bacmid donde se puede observar la banda en la parte superior al gel correspondiente a 136 Kb. 6-10) Amplificación del gen VP1. C-) Control negativo.

Para reconfirmar que el vector pFastBac posea el gen VP1, se determinó la secuencia del inserto en el plásmido recombinante pFastBac-VP1 (Functional Biosciences), utilizando los mismos primers de amplificación del gen VP1. Con esta secuencia se realizó un alineamiento múltiple utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) contra el GenBank y se obtuvo alineamiento con una secuencia que correspondía al gen VP1 perteneciente al serotipo O del virus de la FA de la provincia de Santo Domingo de Tsáchilas (accesión JN005912.1) con un Expect value (E value) de 0 y con un porcentaje de similitud del 94 %. Se encontró también en la base de datos del GenBank que la secuencia se alineaba con este mismo gen proveniente de la provincia de Orellana (código de accesión JN005918.1), Napo (JN005917.1), Bolívar (JN005916.1), Imbabura (JN005915.1), Cotopaxi (JN005914.1) y Los Ríos (JN005911.1). Estos alineamientos tenían el mismo E value de 0 y un 94 % de homología por lo que también se puede asegurar que este mismo serotipo está circulando por varias provincias pertenecientes a las regiones de la Costa, Sierra y Oriente del Ecuador.

El gen de P12A no pudo ser clonado en el plásmido pFastBac ya que no se logró obtener la concentración necesaria de su fragmento escindido purificado para realizar una ligación con el ratio de 1:5. Por ende no fue posible crear los constructos P12A y P12A3C.

Generación de bacmids recombinantes mediante el sistema Bac to Bac

Se realizó la transposición del gen VP1 desde pFastBac-VP1 al bacmid en células DH10Bac, las cuales contienen el bacmid y el plásmido ayudador que codifica para la transposasa encargada de realizar la transposición del cassette de expresión, entre los sitios Tn7 del pFastBac-VP1 con el sitio mini-attTn7 del bacmid. Esta transposición irrumpe el gen *lacZ α* del bacmid, tornando a las DH10Bac lactosa negativas. Para confirmar la presencia de VP1, se extrajo el bacmid de 5 colonias lactosa negativas y se amplificó con los primers de VP1 (Fig.5).

Conclusiones

Se logró establecer el sistema Bac-to-Bac para la generación de bacmids recombinantes que pueden ser uti-

lizados, en un futuro, para la expresión y estudio de proteínas recombinantes de interés como lo son los candidatos de subunidades de vacuna. La expresión de la proteína del gen VP1 del virus de la FA puede ser utilizada para estudios de inmunogenicidad en ganado vacuno ecuatoriano; sin embargo, es necesario continuar con la creación de los constructos P1-2A y P1-2A-3C ya que si bien se ha observado que VP1 puede generar inmunidad en ganado vacuno, ésta no es suficiente debido a que la proteína, por sí sola, no puede plegarse de forma correcta y, por ende, no puede exponer todos sus epítomos para una correcta estimulación del sistema inmune [10]. Por otro lado, Li et al (2008) lograron expresar el constructo P1-2A-3C del serotipo Asia 1 y se logró una inmunidad mayor debido a la presencia de la proteasa 2A y a la proteína 3C que inducen el doblamiento y procesamiento adecuados de la cápside. Consecuentemente, es posible que el constructo de P1-2A-3C en el serotipo O fuera la mejor opción como candidato de subunidad de vacuna [11].

El sistema Bac to Bac es una herramienta útil para la expresión de proteínas complejas que requieren de plegamiento y modificaciones post-traduccionales para su correcta actividad biológica. Además, ha sido explorado para la expresión de antígenos virales que pueden ser utilizados como subunidades de vacunas y, actualmente, existen varias vacunas comerciales de uso humano y animal producidas por este sistema. Algunos ejemplos son CIRCUMVENT, Cervarix, CircoFLEX, entre otros. Por estas razones, el establecimiento de este sistema es un paso muy importante para el estudio de proteínas de relevancia como son los antígenos virales de la fiebre aftosa; los cuales, a largo plazo, podrían traer una alternativa a la solución del problema que genera esta enfermedad dentro del Ecuador.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por el Programa “Chancellor Grants”, Universidad San Francisco de Quito.

Al Instituto Nacional de Higiene (INH) por la donación de las muestras de epitelio de lengua de ganado vacuno infectado con el virus de la fiebre aftosa serotipo O.

Al laboratorio de biotecnología vegetal y de microbi-

ología por su colaboración durante el desarrollo del proyecto.

Referencias

- [1] Strauss, J.; Strauss, G. 2002. "Virus and Human Disease. Plus-Strand RNA and Double-Strand RNA Viruses". *Capítulo 3* : 57 – 122.
- [2] Rodríguez, L.; Grubman, M. 2009. "Foot and mouth disease virus vaccines". *Vaccine*, 27:D90 – D94.
- [3] Brown, F. 1986. "Review Lecture: Foot-And-Mouth Disease - One of the Remaining Great Plagues". *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 229:215 – 226.
- [4] Hoy. 2009. "Aftosa dejaría este año más de \$25 millones en pérdidas". <http://www.hoy.com.ec/noticias-ecuador/aftosa-dejaria-este-ano-mas-de-25-millones-en-perdidas-353857.html>.
- [5] Sáiz, M.; Nuñez, J.; Jimenez-Clavero, M.; Baranowski, E.; Sobrino, F. 2002. "Foot and mouth disease virus: biology and prospects for disease control". *INIA: Madrid, España*.
- [6] Van Oers, M. 2006. "Vaccines for viral and Parasitic Diseases Produced with Baculovirus Vectors". *Advances in virus research*, 68:193 – 253.
- [7] Malirat, V.; Bergmann, I. 2003. "Fiebre Aftosa: Instrumentos moleculares para caracterización viral". *Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*.
- [8] McPherson, M.; Moller, S. 2010. "PCR: The Basics from background to bench". *Garland Science/BIOS Scientific Publishers*.
- [9] Li, Z.; Yi, Y.; Yin, X.; Zhang, Z.; Liu, J. 2008. "Expression of Foot-and-Mouth Disease Virus Capsid Proteins in Silkworm- Baculovirus Expression System and Its Utilization as a Subunit Vaccine". *Plos One*, 3.
- [10] Xu, Y.; Shen, H.; Zhao, M.; Chen, L.; Li, Y.; Liao, M.; Y., L.; Chen, J. 2011. "Adenovirus-vectored shRNAs targeted to the highly conserved regions of VP1 and 2B in tandem inhibits replication of foot-and-mouth disease virus both in vitro and in vivo". *Journal of Virological Methods*.
- [11] Grubman, M. 2005. "Development of novel strategies to control foot-and-mouth disease: Marker vaccines and antivirals". *Biologicals*, 33:227 – 234.

Estandarización de un protocolo para detección de OGMs: evaluación de la presencia de OGMs en granos de soya colectados en diferentes centros de acopio de Ecuador

María de Lourdes Torres^{1*}, Lorena Mejía¹ y Venancio Arahana¹

¹Universidad San Francisco de Quito USFQ, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Campus Cumbayá, Casilla Postal 17-1200-841, Quito, Ecuador.

*Autor principal/Corresponding author, e-mail: ltorres@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: Sonia Zapata, Ph.D.

Recibido/Received: 07/05/2013. Aceptado/Accepted: 27/05/2013.

Publicado en línea/Published on Web: 28/06/2013. Impreso/Printed: 06/06/2013.

Abstract

Soybean is a crop with a national production in Ecuador which is insufficient to meet its demand. Therefore, soybean seeds and soya beans are imported from countries where the use of transgenic soybean has been approved. As a consequence, there is a probability of finding this type of soybean in Ecuadorian territory. In this research, a detection and quantification SYBR Green-based method of genetically modified soybean was standardized. Primers used for the amplification corresponded to specific sequences of the two most representative recombinant elements in GM (genetically modified) crops, the 35S promoter from the Cauliflower Mosaic Virus (P35S) and NOS terminator from Ti plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* (TNOS). These elements generated 200bp and 69bp amplicons respectively. The quantitative analysis was performed generating a standard curve based on the amplification of certified reference materials with 0.01 %, 0.1 %, 1 % y 10 % of GM soybean event GTS 40-3-2, using the above mentioned primers. The detection limit was set at 0.01 % while the quantification limit was set at 0.1 %. In 2 of the 26 soybean samples analyzed, more than 0.1 % of GMOs was found (sample 22 with 0.2 % and sample 23 with 14 %). Additionally, adventitious GMO presence was detected in 8 of the tested samples. Due to Ecuadorian GMO regulations, this kind of analysis is important in order to determine the presence of GMOs in Ecuador, and is clear evidence for the need of trained personnel and specialized institutions for the detection and analysis of GMOs.

Keywords. transgenic, soybean, GMO detection, GM crops, quantification

Resumen

La soya es un cultivo cuya producción nacional en el Ecuador no es suficiente para suplir la demanda interna. Por esta razón, se recurre a la importación de semilla de soya para siembra y soya en grano para consumo, desde países donde el uso de soya transgénica ha sido aprobado. Como consecuencia, existe la probabilidad del ingreso de este cultivo a territorio ecuatoriano. En esta investigación, se estandarizó una metodología para la detección y cuantificación de soya genéticamente modificada con tecnología SYBR Green. Los primers utilizados para la amplificación corresponden a secuencias específicas de los dos elementos recombinantes más representativos en soya genéticamente modificada, el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (P35S) y el terminador NOS del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (TNOS), generando amplicones de 200pb y de 69pb respectivamente. El análisis cuantitativo se realizó a partir de la generación de una curva estándar en base a la amplificación usando los primers mencionados en material de referencia certificado con concentraciones de 0.01 %, 0.1 %, 1 % y 10 % de soya transgénica del evento GTS 40-3-2. El límite de detección se estableció en 0.01 %, mientras que el límite de cuantificación fue establecido en 0.1 %. En 2 de las 26 muestras de soya analizadas se encontró más del 0.1 % de OGM (organismo genéticamente modificado) (muestra 22 con 0.2 % y la muestra 23 con 14 %). Además se detectó presencia adventicia de soya transgénica en 8 de las muestras estudiadas. Debido a las regulaciones de OGMs que existen en el Ecuador, este tipo de análisis es importante para confirmar la presencia de OGMs en el territorio ecuatoriano y evidencia la necesidad de contar con personal capacitado e instituciones especializadas en la detección y análisis de organismos genéticamente modificados.

Palabras Clave. transgénicos, soya, detección de OGMs, cultivo GM, detección, cuantificación

Introducción

A lo largo de la historia, el uso y aceptación de nuevas tecnologías han pasado por un proceso de resistencia, miedo e incluso escepticismo. El uso de las diversas biotecnologías modernas en la producción de alimentos (plantas y animales) no es la excepción, puesto que ha sido objeto de un profundo debate público y político. Un gran porcentaje de estas discusiones se ha centrado principalmente en los organismos genéticamente modificados (OGMs), también conocidos como transgénicos, que pueden tener características particulares gracias a la inserción, delección o silenciamiento de genes específicos en su genoma mediante la técnica de ADN recombinante. Este procedimiento les confiere las características deseadas [1].

En la actualidad, existen cientos de OGMs, que abarcan modificaciones en bacterias, hongos, animales y plantas. Sin embargo, las plantas genéticamente modificadas han generado hasta el momento el mayor debate y regulación. Es así, que de acuerdo a diferentes regulaciones nacionales e internacionales vigentes en muchos países, antes de que un OGM sea utilizado requiere de un profundo análisis de riesgo con el objetivo de determinar potenciales riesgos a la salud humana o al medio ambiente. Previa a la salida al mercado de un OGM, se debe determinar las medidas de gestión de riesgo que se requieren adoptar para minimizar los posibles impactos adversos a la salud humana y al ambiente que pudiera ocasionar un determinado transgénico. Debido a que cada modificación genética es diferente, estos análisis deben realizarse caso por caso, gen dependiente y lugar dependiente, por lo que en el caso de los OGMs no es posible generalizar [1].

El Ecuador, a pesar de haber ratificado el Protocolo de Cartagena el 30 de enero de 2003 [2], no tiene regulaciones específicas en cuestión de Bioseguridad relacionada con organismos genéticamente modificados. El Ministerio del Ambiente ha trabajado durante años para establecer un Marco Regulatorio sobre Seguridad de la Biotecnología que hasta el momento no ha concluido [3]. En la nueva Constitución del Ecuador aprobada en 2008, en el artículo 401 se declara al país libre de semillas y cultivos transgénicos, lo que implicaría la no existencia de organismos genéticamente modificados en el territorio ecuatoriano [4]. Además existen leyes ecuatorianas donde en ciertos artículos se establecen procedimientos sobre el manejo y etiquetado de OGMs pero ninguna de ellas se cumple en la actualidad. Algunos ejemplos de esto son la ley de Defensa del Consumidor que establece que los productos derivados de OGMs deben ser etiquetados de manera resaltada [5] y la Ley Orgánica de Salud, que aclara que la Autoridad Competente del país [6] deberá coordinar con organismos especializados para demostrar la inocuidad y seguridad de alimentos o productos GM tanto para la salud humana como para el medio ambiente, mediante estudios técnicos y científicamente avanzados [7]. A pesar de

los esfuerzos e interés en la creación de una legislación sobre los organismos genéticamente modificados en el Ecuador, los artículos aislados en diferentes leyes no se cumplen y no existe un organismo real encargado del manejo de este tema en el país.

Para el cumplimiento de las regulaciones existentes y para asegurar la declaración de país libre de OGMs, es necesario contar con medios y recursos especializados para este tema y, entre ellos, la detección de organismos genéticamente modificados es uno de los procedimientos principales.

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue la estandarización de una metodología para la detección y cuantificación de soya transgénica mediante PCR en tiempo real, utilizando muestras de soya en grano colectadas en distintos lugares del Ecuador.

Métodos

Material vegetal

Se colectó un total de 26 muestras de semilla de soya: 16 muestras en centros de acopio de la provincia de Los Ríos en los años 2008, 2009 y 2010; y 10 muestras de soya comercializada, adquiridas en el año 2009 en distintas ciudades del país (Tabla 1).

Soya transgénica obtenida del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina (INTA) fue usada como control positivo. Para la calibración de la curva estándar en la amplificación por PCR en tiempo real se usó Material de Referencia Certificado con diferentes fracciones (0.01 %, 0.1 %, 1 % y 10 %) de soya *Roundup Ready* (Evento GTS 40-3-2, línea AG5602 RR) importado desde el IRMM (*Institute for Reference Materials and Measurements*) de la Comisión Europea de la JRC (*Joint Research Centre*).

Las semillas de soya fueron lavadas con agua corriente. Una vez secas, fueron molidas usando un triturador eléctrico. Los residuos de harina de soya que quedaron adheridos en la pared del molino fueron colectados en 3 tubos eppendorf estériles después de cada molienda.

Extracción de ADN genómico y cuantificación

El ADN genómico fue extraído a partir de 3 submuestras de aproximadamente 100mg de harina de soya mediante el uso del kit *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, USA) siguiendo el protocolo *Purification of total DNA from Plant Tissue (Mini protocol)* indicados en el manual *DNeasy Plant Handbook* de Julio 2006. El ADN fue resuspendido en el buffer de elución proporcionado en el kit, mantenido a -20°C hasta ser cuantificado con un Espectrofotómetro *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific, USA).

Origen	Número de muestras	Tipo de muestra	Año de colección
Los Ríos	16	Semilla de soya	2008-2010
Guayas	5	Grano de soya	2009
Azuay	1	Grano de soya	2009
Cotopaxi	2	Grano de soya	2009
Importada	2	Grano de soya y pasta de soya	2009

Tabla 1: Muestras de semillas de soya, soya en grano y pasta de soya, origen y año de colección.

Nombre del Primer	Secuencia Diana	Secuencia del Primer	Tamaño de amplicón
P35S-F P35S-R	Promotor 35S CaMV	GAAGGTGGCTCCTACAAATGC TAGTGGGATTGTGCGTCATCC	200bp
TNOS-F TNOS-R	Terminador NOS	GATTAGAGTCCCGCAATTATACATTAA TTATCCTAGGTTGCGCGCTATATTT	69bp

Tabla 2: Nombre y secuencia de los primers utilizados en esta investigación para la amplificación de P35S y TNOS, y el tamaño de amplicón respectivo [8, 9].



Figura 1: Resultados de amplificación del promotor 35S (200pb) mediante PCR en punto final en las 26 muestras de granos de soya y pasta de soya del estudio. Se observan dos muestras positivas: muestra 22 y muestra 23 (MPM = Marcador de Peso Molecular; B = Blanco; C- = Control negativo y C+ = Control positivo).

Amplificación en punto final del promotor 35S y del terminador NOS

El protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa fue desarrollado para la amplificación del promotor 35S del virus del mosaico de coliflor y del terminador NOS del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* que son elementos frecuentemente usados en el desarrollo de OGMs. La mezcla de las reacciones de amplificación fue preparada en un volumen final de 10ul y contenía buffer de PCR 1X, 1.5U de Taq Polimerasa, 2mM de MgCl₂, 0.5mM de dNTPs, 0.5μM de cada primer (Invitrogen Corporation, California, USA) (Tabla 2) y 200ng de ADN genómico de soya. El termociclador *T-Personal Combi* (Biometra, Alemania) fue programado para la amplificación del promotor 35S con un paso de desnaturalización inicial de 4 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, anclaje de primers a 58°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto, terminando con un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos. El programa de amplificación del terminador NOS inició con desnaturalización a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnat-

uralización a 95°C por 1 minuto, anclaje de primers a 55°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto; la extensión final a 72°C por 10 minutos. Además de las muestras analizadas, se usó ADN de naranjilla en la misma concentración como control negativo.

Los productos de PCR fueron resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % con buffer TBE 1X, teñido con SYBR® *Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, USA). Se usó el marcador de peso molecular *TrackIt 100bp* (Invitrogen, USA). Los geles fueron visualizados mediante iluminación con luz UV en el fotodocumentador *Gel Doc XR* (Bio-Rad, Canadá).

Detección y Cuantificación mediante la amplificación por PCR en Tiempo Real

Para la amplificación en tiempo real se usó el kit *QuantiTect SYBR Green PCR* (Qiagen, USA). La mezcla de las reacciones de amplificación fue preparada en un volumen final de 20ul con 1X de Buffer *QuantiTect SYBR Green*, que contiene las concentraciones adecuadas de MgCl₂, dNTPs, Taq polimerasa y SYBR Green, se agregó además 0.5μM de cada primer y 100ng de ADN de soya.

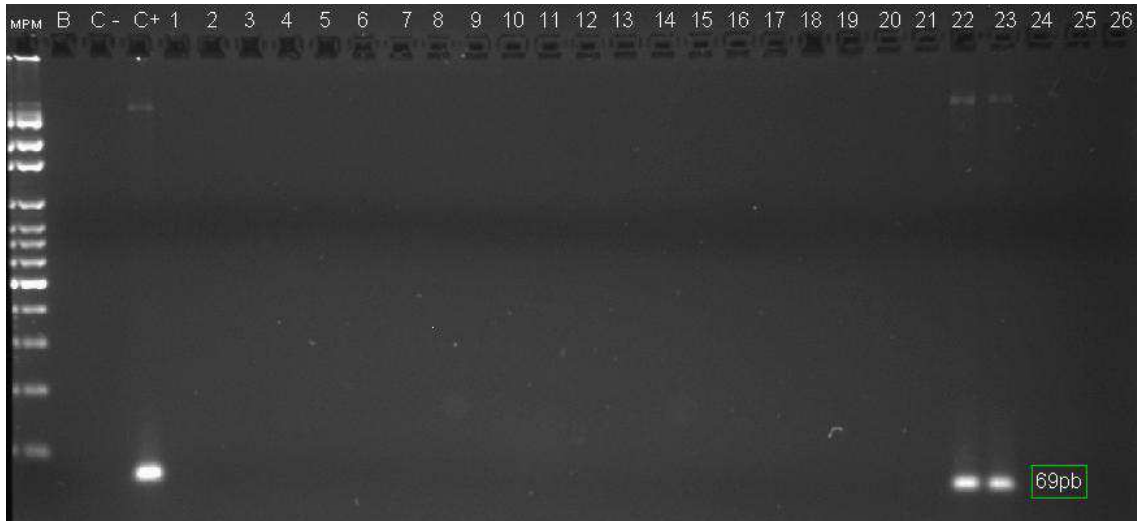


Figura 2: Resultados de amplificación del terminador NOS (69pb) mediante PCR en punto final en las 26 muestras de granos de soya y paste de soya del estudio. Se observan dos muestras positivas: muestra 22 y 23 (MPM = Marcador de Peso Molecular; B = Blanco; C- = Control negativo y C+ = Control positivo).

Para la amplificación del promotor 35S, el termociclador *CFX96* (Bio-Rad, Canadá) fue programado con un paso de desnaturalización inicial a 95°C por 15 minutos, seguido de 43 ciclos de desnaturalización a 95°C por 10 segundos, anclaje de primers a 58°C por 20 segundos y extensión a 72°C por 12 segundos; y para terminar se realizó un análisis de curva de disociación en un rango de temperatura desde 70°C a 95°C con un incremento de 0.5°C cada 15 segundos. Para la amplificación del terminador NOS, se usó el mismo programa que para la detección del P35S, con la única variación en la temperatura de anclaje de los primers de TNOS que fue de 55°C y en el análisis de curva de disociación en la que la temperatura varió desde 60°C a 85°C con un incremento de 0.5°C cada 15 segundos. Las muestras fueron analizadas por duplicado. Además se incluyó una muestra de ADN de naranjilla como control negativo, 4 muestras por duplicado del material de referencia certificado para la calibración de la curva estándar, ADN del plásmido pBI121 como control positivo y una reacción sin ADN como control de contaminación. Los análisis incluidos en cada corrida de amplificación fueron la curva de amplificación, curva estándar, y picos de disociación. La curva estándar permite realizar la comparación de los valores *Ct* (por sus siglas en inglés *Cycle Threshold*) de las muestras analizadas con los valores *Ct* de las muestras del material de referencia certificado para determinar el contenido de OGM.

Resultados y Discusión

Obtención y preparación de muestras

Las muestras de soya procedentes de la provincia de Los Ríos son interesantes ya que corresponden a soya cultivada en el territorio ecuatoriano, a diferencia de las otras muestras que son consumidas pero no necesariamente sembradas localmente.

En el Manual de procedimientos del Laboratorio para detección de OGMs, del Instituto de Investigaciones Alexander Van Humboldt de Colombia, se aclara que el muestreo y la preparación de las muestras son pasos muy importantes en el proceso de análisis de transgénicos y que es crucial que la muestra sea suficientemente representativa del lote que se quiere analizar [10]. En este estudio, las muestras no fueron colectadas personalmente por los investigadores por lo que el procedimiento de muestreo no forma parte de la metodología de este estudio. Por otro lado, para las muestras compradas en distintos mercados y supermercados de Ecuador, al venir previamente empacadas, no es posible certificar que las muestras sean representativas del lote al que pertenecían. Sin embargo, el principal objetivo de esta investigación fue estandarizar el protocolo de amplificación PCR para detectar la presencia o ausencia de soya transgénica en el Ecuador, por lo que la metodología de muestreo podrá implementarse en estudios posteriores.

En esta investigación se siguió la metodología propuesta en el Laboratorio de Detección de OGMs del Instituto de Biotecnología de Buenos Aires - Argentina, el mismo que especifica que la cantidad mínima necesaria para el análisis de evaluación de presencia de OGMs es de 3000 granos ya que tal cantidad asegura los límites de detección y de cuantificación [11]. En este estudio se procesó muestras de 1Kg de semilla de soya que equivale a aproximadamente a 4500 granos.

Detección mediante PCR en punto final

Se observó en gel de agarosa bandas del tamaño esperado de los amplicones correspondientes al promotor 35S (200pb) y al terminador NOS (69pb) en el control positivo y en 2 muestras de las 26 analizadas. Una de las muestras positivas correspondió a soya en grano comprada en un supermercado de Quito (muestra 22) y la segunda correspondió a pasta de soya importada de Argentina (muestra 23) (Figura 1 y 2).

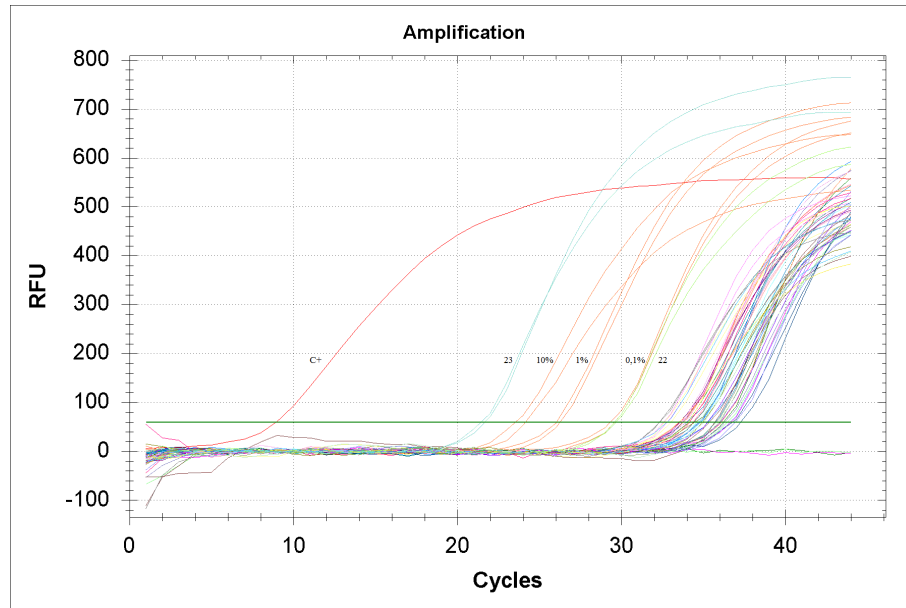


Figura 3: Curvas de amplificación del promotor 35S mediante PCR en tiempo real. Mientras menor es el valor del ciclo en el que la curva de amplificación sobrepasa el umbral (línea horizontal de color verde), mayor es la cantidad inicial de ADN diana. El control positivo, C+, muestra 23, muestras estándares con 10 %, 1 % y 0.1 % de soja GM y muestra 22 son las muestras con cantidad de producto amplificado detectable y cuantificable. (RFU = Unidades de Fluorescencia).

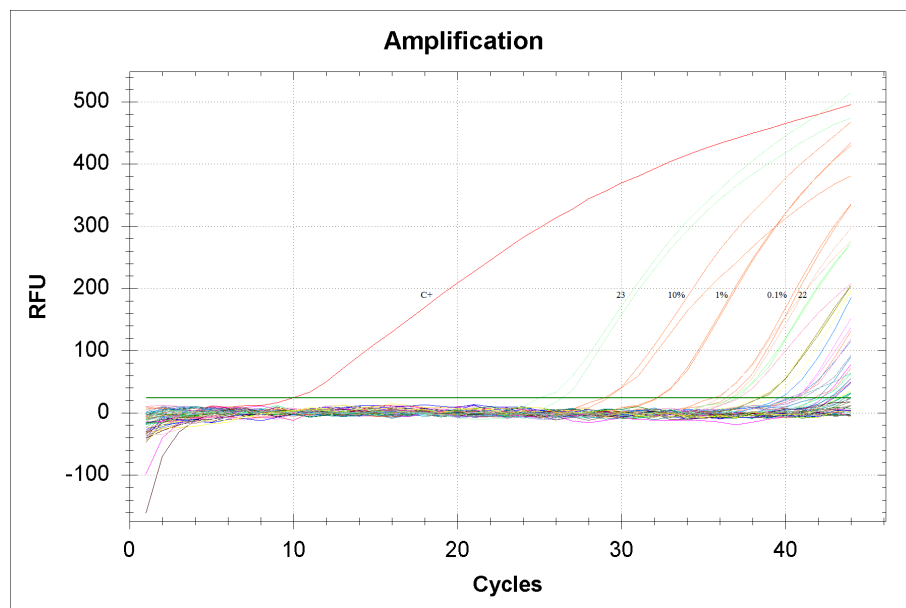


Figura 4: Curvas de amplificación del terminador NOS mediante PCR en tiempo real. Mientras menor es el valor del ciclo en el que la curva de amplificación sobrepasa el umbral (línea horizontal de color verde), mayor es la cantidad inicial de ADN diana. El control positivo, C+, muestra 23, muestras estándares con 10 %, 1 % y 0.1 % de soja GM y la muestra 22 son las muestras con cantidad de producto amplificado detectable y cuantificable. (RFU = Unidades de Fluorescencia).

A pesar de que esta investigación se centra únicamente en el análisis de granos de soja, se decidió incluir la muestra de pasta de soja por ser importada desde Argentina. En ese país, en el 2009 la producción biotecnológica de soja representó el 98.9 % de la producción nacional [12], por lo que la probabilidad de que la pasta de soja sea transgénica era muy alta. Los resultados de este estudio confirman que la pasta de soja contenía en su ADN las secuencias del promotor 35S y del terminador NOS. La pasta de soja al ser alimento procesado ya no se considera ni semilla ni cultivo, por lo que este

resultado no representa un conflicto con el artículo 401 de la Constitución del Ecuador. Sin embargo, al tener resultados positivos en la pasta de soja se demuestra que la Ley de Defensa del Consumidor y la Ley Orgánica de Salud no son cumplidas ya que mencionan que los productos derivados de alimentos genéticamente modificados deben ser etiquetados.

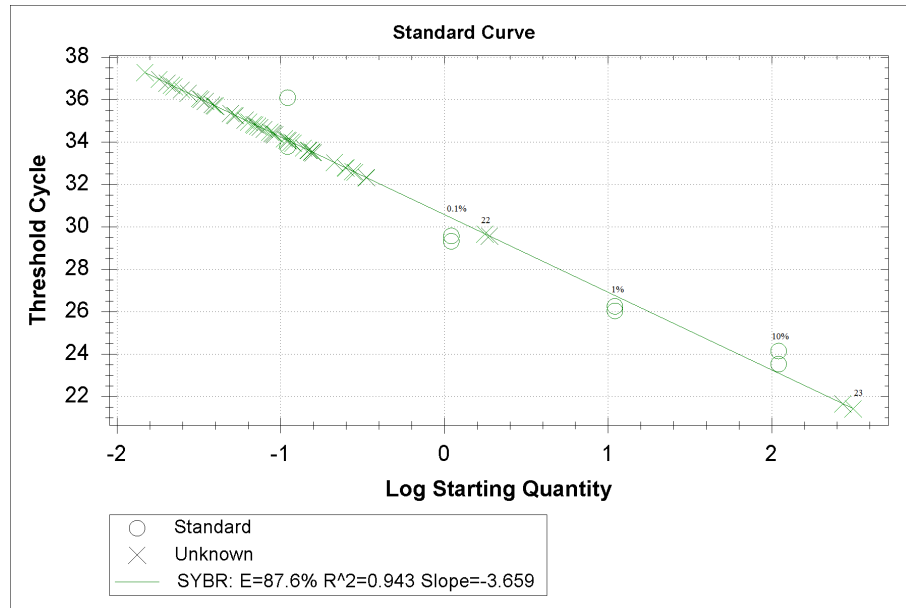


Figura 5: Curva estándar de amplificación del promotor 35S mediante PCR en tiempo real. Los círculos representan el material de referencia certificada (0.01 %, 0.1 %, 1 % y 10 %), Las X representan a las 26 muestras por duplicado. Se señalan las muestras 22 y 23 por tener resultados positivos para la amplificación de la región de interés.

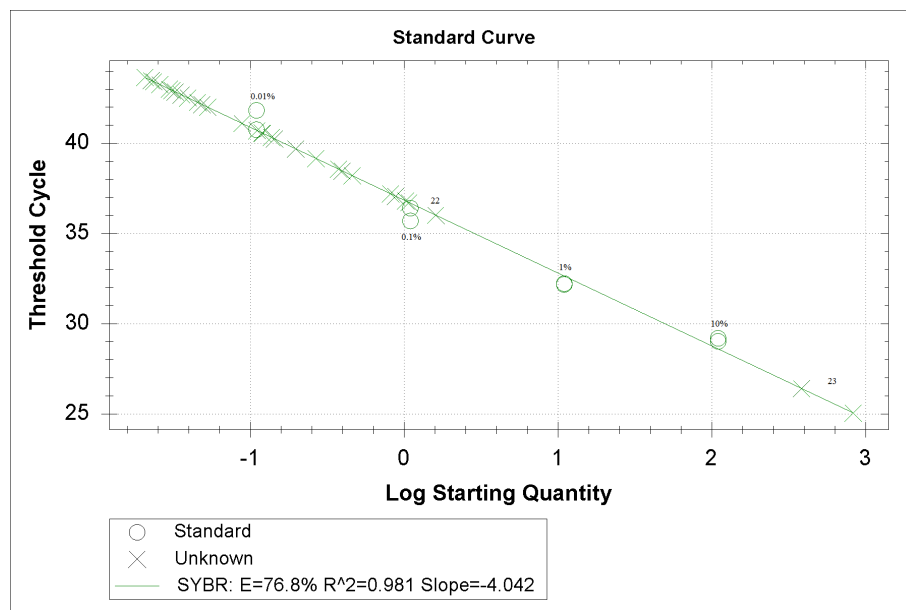


Figura 6: Curva estándar de Amplificación del terminador NOS mediante PCR en tiempo real. Los círculos representan el material de referencia certificada (0.01 %, 0.1 %, 1 % y 10 %), Las X representan a las 26 muestras por duplicado. Se señalan las muestras 22 y 23 por tener resultados positivos para la amplificación de la región de interés.

Detección y Cuantificación mediante PCR en Tiempo Real

Varios estudios de análisis de OGMs se han estandarizado en PCR en punto final [8, 11, 13]. Sin embargo, la eficiencia de la PCR en punto final varía de una reacción a otra e incluso en ciclos sucesivos de una misma reacción, provocando que la amplificación se de en manera no exponencial y a una velocidad de reacción no conocida [14, 15]. La metodología mencionada carece de información cuantitativa exacta, por lo que la presente investigación se centra principalmente en el desarrollo de un método de detección mediante PCR en tiempo real

que permite la cuantificación del contenido de OGM en una muestra determinada.

Se estandarizó un protocolo de detección de OGMs para granos de soja mediante PCR en tiempo real utilizando las temperaturas establecidas en la amplificación mediante PCR en punto final. Los resultados obtenidos en la amplificación por PCR en tiempo real del promotor 35S y del terminador NOS en las 26 muestras coincidieron con los resultados obtenidos en la amplificación por PCR en tiempo final.

En la Figura 3 se aprecian las curvas de amplificación

del promotor 35S de todas las muestras y sus valores C_t respectivos. El ciclo en el que la fluorescencia excede un umbral de detección, el C_t se correlaciona con la cantidad de producto amplificado (cantidad de ADN diana) [15]. Mientras menor es el valor de C_t , mayor es la concentración de ADN diana. La muestra 23 tiene un C_t cerca de 21 y las muestras del material de referencia certificada de 10 %, 1 % y 0.1 % de soya GM son las muestras con menor valor en el C_t (desde 23.5 hasta 29), seguidas de la muestra 22 con un C_t cerca de 30. Es posible apreciar, además, que las muestras restantes tienen amplificación pero en un ciclo demasiado tardío lo que demuestra presencia adventicia de semillas GM, que puede ser definida como “la presencia no intencional, en un lote o envase, de bajos niveles de semillas que no sean de la variedad o híbrido que está siendo comercializado” [16].

En la Figura 4 se presentan las curvas de amplificación del terminador NOS junto a los C_t correspondientes de cada muestra. Es posible observar que el control positivo tiene un C_t cerca de 10, la muestra 23 un C_t cerca de 26, las muestras del material de referencia certificada con contenido de 10 %, 1 % y 0.1 % tienen C_t desde 29 a 35 y la muestra 22 tiene un valor C_t de 36. Estos resultados coinciden con aquellos obtenidos en la amplificación del promotor 35S mediante PCR en tiempo real.

La curva estándar generada en la amplificación del promotor 35S demuestra una eficiencia del 87.6 % y un coeficiente de correlación (R^2) de 0.943 (Figura 5), mientras que para la curva estándar de la amplificación del terminador NOS indica una eficiencia de 76.8 % y un R^2 de 0.981 (Figura 6).

Basándonos en la publicación de Lübeck [15], se decidió establecer el límite de detección en 0.01 % y el límite de cuantificación en 0.1 %. Las dos muestras positivas analizadas se encuentran sobre el valor de 0.1 % por lo que se pudo determinar la concentración de ADN genéticamente modificado. La muestra positiva de soya en grano (muestra 22 en todas las figuras) tiene un porcentaje un poco mayor a 0.1 %, mientras que la muestra de pasta de soya (muestra 23 en todas las figuras) se encuentra muy por encima del valor de 10 % de OGM (Figuras 5 y 6) al comparar con los productos amplificados a partir del material de referencia certificado con los porcentajes de OGM correspondientes.

La mayoría de países en la actualidad tienen métodos de detección validados y laboratorios certificados. La validación de un método de detección es un proceso que demuestra que el conjunto de los procedimientos tanto de extracción de ADN, preparación de la muestra y corrida, y análisis de los resultados obtenidos presentará información precisa, confiable, reproducible y veraz. Las características de un protocolo para ser validado deben representar excelente precisión, eficiencia, exactitud, reproducibilidad, sensibilidad y especificidad. Un nuevo método para ser validado debe ser ensayado en

varios laboratorios para verificar la calidad de sus resultados [15].

En el presente estudio, una vez estandarizado el protocolo, se comprobó que la tecnología basada en SYBR Green permite la detección y cuantificación de las muestras positivas. Siew-Ping, Yoke-Kqueen y Son [17] realizaron una evaluación de soya genéticamente modificada en 122 muestras de alimentos y concluyeron que el método de amplificación mediante SYBR Green produce resultados rápidos, reproducibles y estadísticamente sensitivos para la cantidad de muestras analizadas.

Esta investigación se basó en secuencias específicas al promotor 35S y terminador NOS y, al ser estas secuencias comunes para varios OGMs, es necesario que los eventos de las muestras positivas sean identificados. Es muy posible que la soya positiva para la presencia de los elementos analizados pertenezca al evento GTS 40-3-2, ya que es el evento predominante en los países de donde se importa soya al Ecuador; sin embargo, James [18] menciona que existen 14 eventos de soya GM aprobados en distintos países, pero en la bibliografía se encuentran 10 eventos aprobados [19, 20] y no todos contienen los elementos amplificados en este estudio. Lo importante de esta información es que se demuestra que 6 de los 10 eventos aprobados pueden ser evaluados mediante la metodología estandarizada en este estudio, pero los resultados obtenidos usando PCR en tiempo real indican que las muestras de soya GM pueden pertenecer a dos eventos distintos: MON 04032 o DD 026005-3 ya que las dos transformaciones contienen tanto el promotor 35S como el terminador NOS.

Cuando un producto alimenticio es evaluado y es positivo para la presencia de OGMs, los pasos a seguir son verificar mediante PCR en tiempo real a qué evento de transformación genética pertenece para así comprobar si se cumple la legislación vigente (si la modificación genética ha sido aprobada en el país donde se realiza el análisis y si la cantidad autorizada de OGM presente en el alimento es cumplida) [8, 13]. Para que este tipo de evaluaciones puedan ser realizadas en el país, es primordial instaurar instituciones especializadas en detección de OGMs e identificación de eventos de transformación específicos.

El aporte de este trabajo fue el estandarizar una metodología para la detección y cuantificación de soya transgénica mediante PCR en tiempo real con tecnología SYBR Green. Además se determinó la presencia de soya transgénica en 2 de las 26 muestras analizadas.

El análisis de riesgo de los OGMs debe basarse en criterios técnicos y científicos coherentes, es por eso que el Ecuador debe establecer un marco regulatorio claro para el manejo de organismos genéticamente modificados. En este contexto, y considerando las regulaciones vigentes en el país, este marco debe contar con los procedimientos adecuados e internacionalmente validados para detectar, identificar y cuantificar organismos genéticamente modificados en cultivos y alimentos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad San Francisco de Quito USFQ (Ecuador) por el financiamiento de esta investigación (Small Grants Program 2008), y a la Dra. Lewi del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina por el envío de la muestra molida de soja transgénica para ser usada como control positivo en este estudio. Agradecen también a Bernardo Gutiérrez por la revisión del presente manuscrito.

Referencias

- [1] Villalobos, V. 2008. “Los Transgénicos: Oportunidades y amenazas”. *Mundi-Prensa: D.F.*
- [2] Convenio sobre la Diversidad Biológica. 2011. “Partes en el Protocolo. Situación de Ratificación y Entrada en vigencia”. *Enlace: <http://bch.cbd.int/protocol/parties/>, Biosafety Clearing House: Montreal, Fecha de Consulta: 8 mayo 2011.*
- [3] Convenio sobre la Diversidad Biológica. 2009. “Experto en la Seguridad de la Biotecnología”. *Enlace: <http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=100158>, Biosafety Clearing-House : Montreal, Fecha de Consulta: 11 mayo 2011.*
- [4] Congreso Nacional. 2008. “Constitución del Ecuador”. *Enlace: http://www.asambleanacional.gov.ec/documentos/constitucion_de_bolsillo.pdf, Asamblea Constituyente: Quito, Fecha de Consulta: 9 julio 2009.*
- [5] Congreso Nacional. 2000. “Ley Orgánica de Defensa del Consumidor (Ley No. 2000-21)”. *Enlace: http://www.micip.gov.ec/index.php?option=com_content&view=article&id=458&Itemid=135, Ministerio de Industrias y Productividad: Quito, Fecha de Consulta: 20 abril 2011.*
- [6] Congreso Nacional. 1999. “Ley de Gestión Ambiental”. *Enlace: <http://www.conelec.gob.ec/images/documentos/LEY%20DE%20GESTION%20AMBIENTAL.doc>, Consejo Nacional de la Electricidad: Quito, Fecha de Consulta: 25 abril 2011.*
- [7] Congreso Nacional. 2006. “Ley Orgánica de Salud”. *Enlace: http://www.bioetica.org.ec/c_ley_salud.pdf, Bioética.org: Quito, Fecha de Consulta: 20 mayo 2011.*
- [8] Tozzini, A.; Martínez, C.; Lucca, F.; Vázquez, C.; Distéfano, A.; del Vas, M.; Hoop, E. 2000. “Semi-quantitative detection of genetically modified grains based on CaMV 35S promoter amplification”. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3(2): <http://www.scielo.cl/pdf/ejb/v3n2/art08.pdf>.
- [9] Barbau-Piednoir, E.; Lievens, A.; Mbongolo-Mbella, G.; Roosens, N.; Sneyers, M.; Leunda-Casi, A.; Van den Bulcke, M. 2010. “SYBR Green qPCR screening methods for the presence of “35S promoter” and “NOS terminator” elements in food and feed products”. *European Food Research and Technology*, 230:383 – 393.
- [10] Álvarez, E.; Castellanos, J.; Maldonado, C. 2007. “Manual de procedimientos de laboratorios para detección de organismos genéticamente modificados”. *Enlace: http://www.bch.org.co/bioseguridad/doc/Manual_LaboratorioOGM.pdf, Instituto de Investigaciones de Recursos Bibliográficos Alexander Von Humboldt: Bogotá, Fecha de Consulta: 24 abril 2011.*
- [11] INTA. 2002. “Análisis de Detección de Organismos Genéticamente Modificados”. *Enlace: http://www.inta.gov.ar/biotec/servicios/deteccion_ogm.htm, Laboratorio de Detección de OGMs. Instituto de Biotecnología: Buenos Aires, Fecha de Consulta: 26 marzo 2011.*
- [12] The American Soybean Association. 2010. “World Statistics. Adoption of Biotech-enhanced Soybean Seedstock 1997-2009”. *Enlace: <http://www.soystats.com/2010/Default-frames.htm>, Soy Stats: Saint Louis, Fecha de Consulta: 21 septiembre 2010.*
- [13] Tengel, C.; Scüßler, P.; Setzke, E.; Balles, J.; Sprenger-Haußels, M. “PCR-Based Detection of Genetically Modified Soybean and Maize in Raw and Highly Processed Foodstuffs”. *BioTechniques*, 31:426 – 429.
- [14] Weighardt, F. “Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. Sesión 10. PCR Cuantitativa para la Detección de OGM”. *Enlace: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/Sesi%C3%B3n10.pdf>, Joint Research Center. Institute for Health and Consumer Protection, Fecha de Consulta: 26 marzo 2011.*
- [15] Lübeck, M. “Detection of genetically modified plants - methods to sample and analyse GMO content in plants and plant products”. *Enlace: <http://www.sns.dk/erhvogadm/biotek/detection.htm>, Skov- og Naturstyrelsen, Fecha de Consulta: 17 marzo 2011.*
- [16] Teichert, S.; André, M. 2009. “Límites de Tolerancia para Semillas Adventicias”. *Enlace: http://www.seednews.inf.br/_html/site_es/content/reportagem_capa/imprimir.php?id=39, SeedNews: Pelotas, Fecha de Consulta: 26 abril 2011.*
- [17] Siew-Ping, K.; Yoke-Kqueen, C.; Son, R. 2011. “Quantitative analysis of Roundup Ready soybean content in soy-derived food and animal feed by using Real-time PCR incorporated with cloned DNA fragments”. *International Food Research Journal*, 18:507 – 514.
- [18] James, C. 2010. “Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010”. *Enlace: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/42/executivesummary/default.asp>, ISAAA: Ithaca, Fecha de Consulta: 11 noviembre 2010.*
- [19] Joint Research Centre. 2010. “Status of Dossiers”. *Enlace: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/statusofdoss.htm>, European Commission Joint Research Centre. European Union Reference Laboratories of GM Food and Feed, Fecha de Consulta: 20 septiembre 2010.*

- [20] ILSI. "Listing of Query Results. Soybean". *Enlace: http://ceragmc.org/index.php?action=gm_crop_database&mode=Submit&hstID_XCode=8*. Center for Environmental Risk Assessment. GM Crop Database, Fecha de Enlace: 20 abril 2011.

Genetic diversity of an entomopathogenic fungi collection from Ecuador using a modified AFLP approach

Venancio Arahana^{1*}, Nicolás Bastidas¹, María de Lourdes Torres¹ y Pedro González²

¹Universidad San Francisco de Quito USFQ, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Campus Cumbayá, Casilla Postal 17-1200-841, Quito, Ecuador.

²Iowa State University, Department of Agronomy, Ames, IA 50011-1010, USA.

*Autor principal/Corresponding author, e-mail: varahana@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: Sonia Zapata, Ph.D.

Recibido/Received: 07/05/2013. Aceptado/Accepted: 27/05/2013.

Publicado en línea/Published on Web: 28/06/2013. Impreso/Printed: 06/06/2013.

Abstract

The genetic diversity of 41 Ecuadorian entomopathogenic fungal strains plus one isolate from the USA, from a collection maintained by INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias) was determined using a modified AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) approach. We found genetic similarity indexes lower than 0.50 and 121 polymorphic bands. The AMOVA analysis revealed that between-group and within-group variation contributed in similar amounts (59% and 41%, respectively) to the whole genetic variation detected. The dendrogram built using Jaccard's genetic coefficient shows twelve groups, where seven of them contain isolates clustered by genus. From these seven groups, five of them contain isolates clustered by the host from which they were recovered. The Bootstrap values show twelve reliable phylogenetic relations with values higher than 70% of confidence. The Principal Components Analysis (PCA) produced six clusters; four of them contain isolates associated by genus. The results suggest the existence of a considerable genetic diversity within the INIAP's entomopathogenic fungi collection, and a clustering tendency related to the host from which they were isolated. We did not find common genomic regions among the most virulent entomopathogenic fungi strains. The high genetic diversity found within this collection represents a potential source of genotypes with potent bioinsecticide activity.

Keywords. Biocontrol, Genetic Diversity, AFLP, Entomopathogenic fungi, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Verticillium*

Resumen

Se determinó la diversidad genética de 41 cepas ecuatorianas de hongos entomopatógenos y un aislamiento de los EEUU, de una colección mantenida por el INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias) utilizando un protocolo modificado de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Se encontraron índices de similitud genéticos inferiores a 0.50 y 121 bandas polimórficas. El análisis AMOVA reveló que la variación entre grupos y dentro de grupos contribuían en cantidades similares (59% y 41% respectivamente) a la variación genética total detectada. El dendrograma construido a partir del coeficiente genético de Jaccard muestra doce grupos, de los cuales siete contienen aislamientos agrupados por género. De estos siete grupos, cinco contienen aislamientos agrupados en base al huésped de donde se recolectaron. Los valores de Bootstrap muestran doce relaciones filogenéticas confiables con valores de confianza mayores al 70%. El análisis de componentes principales (PCA) produjo seis grupos; cuatro de ellos contienen aislamientos asociados por género. Estos resultados sugieren la existencia de una diversidad genética considerable dentro de la colección de hongos entomopatógenos del INIAP, y una tendencia de agrupamiento relacionada con el huésped de donde fueron aislados. No se encontraron regiones genómicas comunes dentro de las cepas más virulentas de hongos entomopatógenos. La elevada diversidad genética dentro de esta colección representa una fuente potencial de genotipos con actividad bioinsecticida potente.

Palabras Clave. Biocontrol, Diversidad Genética, AFLP, Hongos entomopatógenos, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Verticillium*

Introduction

Entomopathogenic fungi are microorganisms capable of controlling pest insects that affect economically important crops worldwide. Spores of entomopathogenic fungi germinate and grow upon the cuticles of vulnerable hosts, and both physical and enzymatic activities produce the breaking of insect cuticles. This process allows the internal colonization of the insects by the fungus which ultimately causes the insects death [1].

Beauveria, *Metarhizium* and *Verticillium* are the most widely used entomopathogenic fungi genera due to their high effectiveness as biopesticides. The two main *Beauveria* species, *B. bassiana* and *B. brongniartii*, are frequently employed to control coleopteran and lepidopteran pests [2]; *Metarhizium anisopliae* is usually used to control members of the Isoptera, Orthoptera, Hemiptera and Coleoptera families [3]. Finally, *Verticillium lecanii* is an important fungal control agent of whiteflies and aphids [4]. In general, *Beauveria* and *Metarhizium* species have a wide range of possible hosts; however, particular strains or genotypes usually exhibit a more restricted host range [2, 3].

Benefits of entomopathogenic fungi usage include: little environmental impact, slight detrimental effects on plants and animals, minor effects on soil microbiota and little risk to human health [2, 3]. The economic potential of entomopathogenic fungi as biocontrol agents in agriculture has been evidenced by successful experiences on biological pest management since the 1970s. China, for instance, used *B. bassiana* in about 1.05 million hectares until the 1980s. Brazil also used this strategy on approximately one million hectares which were treated, in 2008, with *M. anisopliae* for controlling spittlebug [5].

The availability of indigenous virulent fungal isolates is a determining factor for the success of new biocontrol programs, and therefore the collection of indigenous strains and the determination of their virulence, are typically starting points for a biological pest management implementation [5].

Nowadays, the determination of the genetic diversity of fungal strains has also become a regular practice in biocontrol research, given that the natural variability is the main source of new genotypes with biopesticide potential. Molecular techniques have become frequent analysis methods, since it is now well-known that morphological characters such as conidia's size and shape are often not enough to reveal differences among species and/or strains [6]. Numerous studies have used molecular markers and DNA-sequence analysis to evaluate the polymorphisms in entomopathogenic fungi and to investigate possible correlations between genotype and geographical origin, pathogenicity or host range [1, 7–11].

Ecuador, a megadiverse country, could benefit from the use of entomopathogenic fungi in crop pest control. Consistent with this idea, INIAP (Instituto Nacional Autónomo

de Investigaciones Agropecuarias) has established a collection of indigenous strains mostly isolated from coleopteran species in Ecuadorian highlands. Most of these isolates have already been morphologically classified and tested in terms of pathogenicity against *Premnotrypes vorax*, *Macroductylus pulchripes*, and *Metamasius hemipterus*; frequent pests of potato, maize and sugarcane, respectively [12–16]. In this study, we employed a modified AFLP approach to evaluate the genetic diversity of an Ecuadorian entomopathogenic fungi collection mainly composed by *Beauveria* and *Metarhizium* isolates.

Materials and Methods

Fungal isolates

Forty-two monosporic entomopathogenic fungal isolates (Table 1) from a collection of INIAP were used in this study. These isolates represent four different genera (*Beauveria* (26), *Metarhizium* (9), *Verticillium* (2) and *Candida* (1)), plus four unidentified isolates. Forty one of these isolates came from different locations in Ecuador and were isolated from corresponding host insects, and one isolate (V037) came from the United States (Ohio University collection). All but four isolates (U058, U060, U061 and U062) were identified at the genus level using morphological descriptors by INIAP's researchers. Each isolate was assigned a code consisting in the initial letter of the genus, followed by an ordinal number.

DNA Extraction from fungal mycelium

To increase the amount of mycelium available for DNA extraction, all fungal isolates were grown for one week in PDA (Potato Dextrose Agar) medium supplemented with gentamicin (40 mg/L). Agar plugs of 5 mm diameter were taken from the edge of growing mycelium and transferred to a fresh Petri dish containing PDA medium. The plates were incubated at 28°C. Genomic DNA was isolated using a CTAB-based protocol [17] with the addition of Sand White Quartz (Sigma) during mycelium maceration (1:3 ratio) to efficiently break the fungal cell walls. One hundred and fifty milligrams of fungal mycelium from each isolate yielded 30-170 ng/ μ l DNA, estimated by using a QubitTM fluorometer (Invitrogen) and a Quant-iTTM dsDNA BR Assay quantification kit (Invitrogen).

Modified AFLP analyses

A modified AFLP approach based on the AFLP Analysis System 1 (Invitrogen) was used to evaluate the genetic diversity of the fungal collection. Due to the reduced number of bands (3-8) generated by PCR amplification using several combinations of selective AFLP primers, which was attributed to the small fungal genome size (*Beauveria bassiana*: ~40 Mbp, *Metarhizium anisopliae*: ~30 Mbp) [18, 19], the analysis was based on a double PCR amplification approach using the preselective combination of EA/MC primers. This strategy produced clear and informative fingerprint patterns for all DNA samples analyzed (Fig. 1).

Isolate code	Fungus Species	Host	Origin	
			Locality	Province
M001	<i>Metarhizium sp.</i>	<i>Macroductylus sp.</i> adult	Alance	Pichincha
M004	<i>Metarhizium sp.</i>	<i>Scarabaeidae</i> pupa	Alobuela	Pichincha
M005	<i>Metarhizium sp.</i>	<i>Macroductylus sp.</i> adult	Alobuela	Pichincha
M007	<i>Metarhizium sp.</i>	<i>Macroductylus sp.</i> adult	Alobuela	Pichincha
M010	<i>Metarhizium sp.</i>	<i>Scarabaeidae</i> larva	El Carmen	Bolívar
M032	<i>Metarhizium sp.</i>	-----	Hilsea (Floriculture Company)	Pichincha
M036	<i>Metarhizium sp.</i>	<i>Premnotrypes vorax</i> larva	Santa Marta de Cuba	Carchi
M100	<i>Metarhizium sp.</i>	<i>Scarabaeidae</i> larva	Tablas	Bolívar
M101	<i>Metarhizium sp.</i>	<i>Scarabaeidae</i> larva	San Franc. de Asapi	Bolívar
B012	<i>B.brongniarti</i>	<i>Macroductylus sp.</i> adult	San José de Minas	Pichincha
B013	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Macroductylus sp.</i> adult	Alance	Pichincha
B014	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Macroductylus sp.</i> adult	El Carmen	Bolívar
B015	<i>Beauveria sp.</i>	Unidentified scarab	Alance	Pichincha
B016	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Premnotrypes vorax</i> larva	Chanchaló	Cotopaxi
B017	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Premnotrypes vorax</i> larva	San. José de Huaca	Carchi
B018	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Premnotrypes vorax</i> larva	San Cristobal Island	Galápagos
B021	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Premnotrypes vorax</i> larva	San Francisco	
B022	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Premnotrypes vorax</i> larva	Trebon Guabug	Chimborazo
B023	<i>B.brongniarti</i>	<i>Premnotrypes vorax</i> larva	-----	-----
B024	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Premnotrypes vorax</i> larva	E. E. Santa Catalina	Pichincha
B025	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Premnotrypes vorax</i> larva	Yacubamba	Cotopaxi
B026	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Premnotrypes vorax</i> larva	4 esquinas	Chimborazo
B028	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Premnotrypes vorax</i> larva	Huacona San José	Chimborazo
B029	<i>Beauveria</i>	<i>Premnotrypes vorax</i> larva	Sablog	Chimborazo
B030	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Coleop/Sthaphilidae</i>	Tumbaco	Pichincha
B031	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Premnotrypes vorax</i> larva	Pull Chico	Pichincha
B043	Possible <i>Beauveria</i>	<i>Scarabaeidae</i> adult	Río Negro	
B102	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Macroductylus sp.</i> adult	Chontapamba	
B103	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Premnotrypes vorax</i> adult	Cotojuan	Chimborazo
B104	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Premnotrypes vorax</i> larva	-----	-----
B105	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Scarabaeidae</i> larva	Jhashi	Bolívar
B106	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Scarabaeidae</i> larva	S. F. Asapi	Bolívar
B107	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Premnotrypes vorax</i> adult	Shaushi	Tungurahua
B109	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Premnotrypes vorax</i> larva	Huacona San José	Chimborazo
B110	<i>Beauveria sp.</i>	Un-identified scarab	Alance	Pichincha
V037	<i>Verticillium lecanii</i>	-----	Ohio University	USA
V038	<i>Verticillium lecanii</i>	-----	Universidad Central del Ecuador	Pichincha
C040	<i>Candida sp.</i>	Soil Isolate	-----	Galápagos
U058	-----	<i>White Fly nymph</i>	Mascarilla V. Chota	Imbabura
U060	-----	<i>White Fly nymph</i>	Mascarilla V. Chota	Imbabura
U061	-----	<i>White Fly nymph</i>	Mascarilla V. Chota	Imbabura
U062	-----	<i>White Fly nymph</i>	EESC Cutuglagua	Pichincha

* Except for isolate V037, all strains used in the study were isolated in Ecuador by INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias). Isolate code consists of the initial of the fungal genus followed by an ordinal number.

Table 1: Passport information of the INIAP's entopathogenic fungal isolates used in this study.

DNA digestion, adapter's ligation and preamplification reactions were performed according to the AFLP Kit manufacturer's instructions. A second amplification of the preamplified DNA samples using the preselective AFLP primer combination EA/MC was performed to increase banding intensity on the polyacrylamide gel. Products were resolved on a 6% polyacrylamide gel in 1X TBE and visualized by staining with AgNO₃ following the protocol described by Benbouza et al [20].

Statistical analyses

Banding patterns were treated as binary data (each band in an isolate was scored as 1 if present, or 0 if absent). A similarity matrix, an UPGMA dendrogram and a principal component analysis (PCA) comparison matrix were performed using Jaccard's coefficient in the NT-SYSpC (Ver. 2.0) software (Exeter Software, Setauket, NY). A bootstrap analysis, using the WINBOOT software (Ver, 2.0) (IRRI, Manila, Philippines), was also performed to evaluate the robustness of the phylogenetic relationships found. Finally, an analysis of molecular variance

(AMOVA) was carried out to calculate genetic variation between and within groups of the UPGMA dendrogram by using the GENALEX 6 Software (School of Botany and Zoology, The Australian National University, Canberra, Australia).

Results

Genetic Diversity and Clustering

Double PCR amplification using the AFLP preselective primer combination EA/MC produced a total of 121 scorable bands which were 100% polymorphic for the whole fungal collection analyzed. The number of bands per genus was as follows: *Beauveria* (105 bands), *Metarhizium* (44 bands), *Verticillium* (20 bands), *Candida* (16 bands) and four unidentified fungal strains recovered from white flies (Aleyrodidae) (21 bands). All bands observed within each one of the four genera analyzed were also 100% polymorphic for all strains of the corresponding genus. For example, each one of the 44



Figure 1: Fingerprint patterns of 12 entomopathogenic fungal isolates, generated by using the preselective primer combination EA/MC, and visualized by silver staining. A considerable homogeneity among DNA profiles of *Metarhizium* isolates (lanes I = M001, J = M005, K = M007 and L = M010) and two of the *Beauveria* isolates (lanes A = B030 and B = B031), is shown. The rest of lanes correspond to C = B029, D = V037, E = B106 F = M101, G = B104, H = B103.

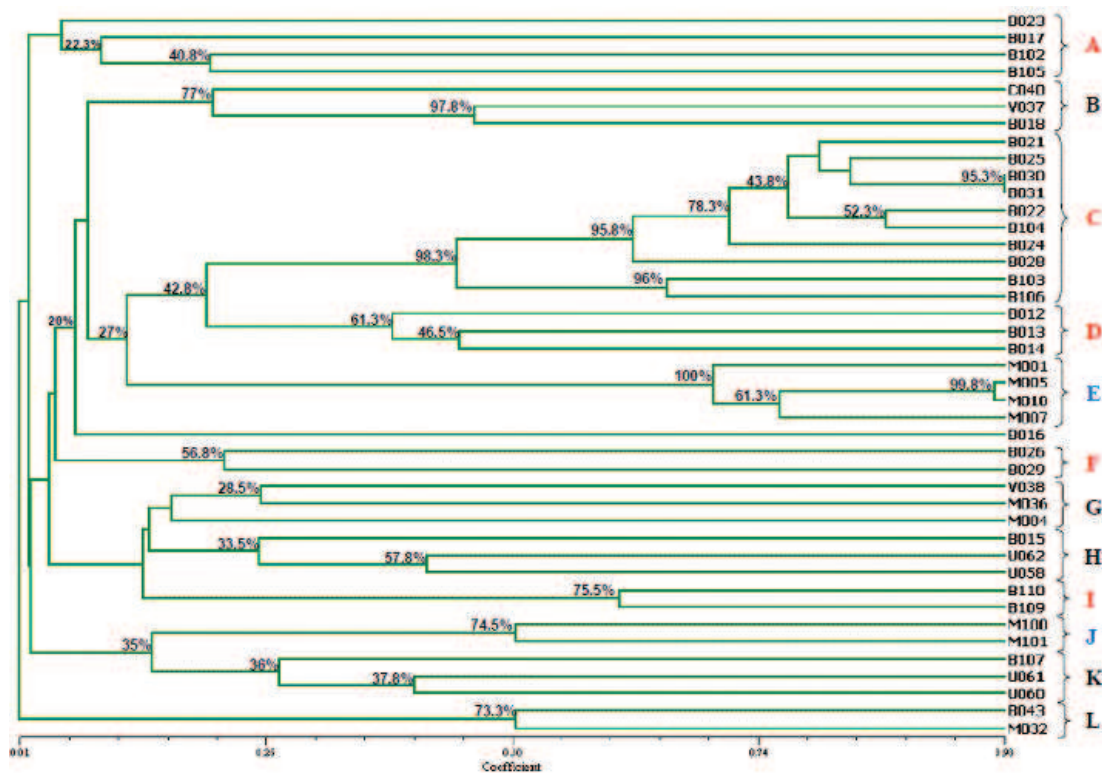


Figure 2: Dendrogram based on Jaccard's similarity coefficient for 41 Ecuadorian entomopathogenic fungal isolates and one isolate from the USA. UPGMA clustering produced twelve well-defined groups (A - L), seven of them associated by genera (A, C, D, E, F, I, J). Five groups, out of twelve, are associated both by genera and host preference (C, D, E, F, J). Numbers on branches indicate bootstrap (%) support for 400 replicates. The bootstrap analysis shows twelve trustworthy phylogenetic relations with values higher than 70% of confidence.

bands displayed by the *Metarhizium* isolates analyzed in this study was absent at least in one isolate from this genus. The genetic similarity indexes were lower than 0.50 for most of the phylogenetic relationships between strain pairs. Based on cluster analysis by the UPGMA method, twelve groups were obtained; seven of them contained isolates clustered by genus (Fig. 2). From these seven groups, five contained isolates also clustered by the host from which they were recovered. According to the AMOVA analysis, within-group differentiation and between-group differentiation accounted for 41% and 59% (prob.: 0.591) of the whole variation observed, respectively.

Five groups (A, C, D, F, I), out of twelve defined, are constituted exclusively by *Beauveria* isolates. Based on the number of isolates included, group C constitutes a major cluster (10 isolates) whereas groups A, D, F, & I are minor clusters (2-4 isolates). Group C contains isolates recovered from *Premnotrypes vorax* larvae (B021, B022, B024, B025, B028, B031, B103 & B104) with two exceptions, B030 and B106. The highest levels of genetic similarity (Jaccard's coefficient) among *Beauveria* isolates of the collection were showed by strain pairs within this cluster: B022 & B104 (0.86), B025 & B030 (0.84), B025 & B031 (0.82), and B030 & B031 (0.976). This last pair represents isolates from two different hosts in two distinct locations (Tumbaco and Pull Chico, Pichincha - Ecuador). Group A contains iso-

lates obtained from *Premnotrypes vorax* larvae (B017, B023), a *Macroductylus sp.* adult (B102) and a *Scarabaeidae* larva (B105). Group D is constituted by strains B012, B013 & B014; all of them recovered from *Macroductylus sp* adults. Group F contains isolates B026 and B029, both of them recovered from *Premnotrypes vorax* larvae. Finally, Group I is constituted by two strains; B110, isolated from an unidentified beetle (Coleoptera), and B109, recovered from a *Premnotrypes vorax* larva. B016, also obtained from a *Premnotrypes vorax* larva, appears as an independent lineage not closely related to the rest of the *Beauveria* groups (Fig. 2).

Even though all *Metarhizium* isolates are not clustered together in a unique group, there are two well defined groups, E and J, constituted exclusively by *Metarhizium* strains. Group E enclosed four fungal isolates, three of them (M001, M005, M007) recovered from *Macroductylus sp.* larvae, and one (M010) obtained from a *Scarabaeidae* larva. Interestingly, despite isolates M005 & M010 were recovered from different hosts in different locations (Alobuela and El Carmen, respectively), they presented the highest level of genetic similarity (0.97) among isolates of this cluster. Isolates M005 & M007 share the same site of collection (Alobuela, Pichincha - Ecuador) and both were isolated from *Macroductylus sp.* larvae, but they exhibit lower genetic similarity (0.74) than isolates M005 & M010. Finally, Group J consists of two strains, M100 and M101, which were

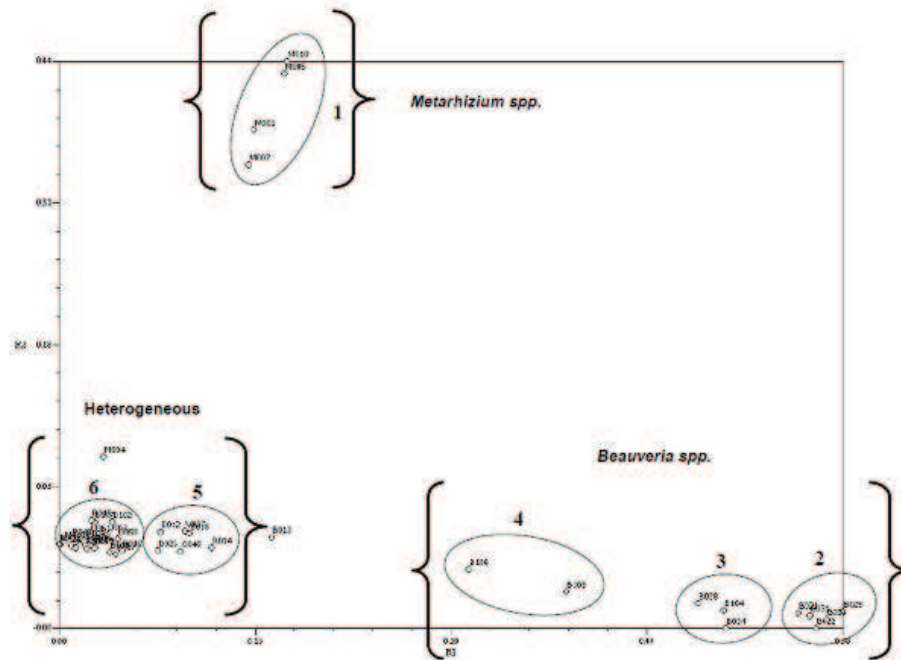


Figure 3: Principal component analysis on 41 Ecuadorian fungal isolates and one isolate from the USA based on preamplification AFLP data. Group 1 is composed exclusively by *Metarhizium* isolates, whereas groups 2, 3 and 4 include *Beauveria* isolates only. Groups 4 and 6 are heterogeneous sets which enclose different genera isolates.

isolated from *Scarabaeidae* larvae.

The two *Verticillium lecanii* strains included in this study have been assigned to separate groups (B and G) of the dendrogram. Group B is a heterogeneous cluster formed by three fungal isolates belonging to three different genera; V037 (*Verticillium lecanii*), C040 (*Candida*) and B018 (*Beauveria*). B018 and C040 share the same site of origin, the Galapagos Islands, but belong to different genera and are genetically dissimilar (0.21 similarity). Group G enclosed the second *Verticillium lecanii* strain (V038), and two *Metarhizium* isolates (M004, M036). M004 and M036 were recovered from different host species in Alobuela (Pichincha, Ecuador) and Santa Martha de Cuba (Carchi, Ecuador), respectively.

Fungal isolates which lack morphological identification are placed in groups H (U058, U062) and K (U060, U061), associated with two *Beauveria spp.* strains; B015 for Group H and B107 for Group K. The genetic similarity among isolates conforming clusters H and K is considerably low, in both cases lower than 0.31. Finally, different genera strains M032 (*Metarhizium*) and B043 (*Beauveria*) are grouped together in Group L.

It is important to observe that the geographical origin of the strains from the INIAP's collection is diverse; thus, UPGMA grouping does not suggest a correlation between the origin of the host insects and the phylogenetic relationships between the fungal strains isolated from them.

The bootstrap analysis performed showed twelve reliable phylogenetic relationships, seven of them with val-

ues higher than 90% of confidence, and the remaining five with values above 70% (Fig. 2).

PCA dispersion Analysis and Fungal Virulence

The two-dimensional PCA dispersion plot matches to a great extent the results produced by the dendrogram generated by the UPGMA cluster analysis. Four groups, out of six defined, can be easily related to the UPGMA dendrogram; Group 1 (formed exclusively by *Metarhizium* isolates) corresponds to Group E from the dendrogram, and collectively groups 2, 3 and 4 of the PCA dispersion plot (formed exclusively by *Beauveria* isolates) corresponds exactly to Group C from the dendrogram (Fig. 3). The remaining two groups of the PCA dispersion plot, 5 and 6, are heterogeneous sets formed by varied fungal isolates (*Beauveria*, *Metarhizium*, *Verticillium*, and *Candida*) (Fig. 3).

Although B018, M005 and M101 are typified by the INIAP researchers as the most virulent fungal isolates of the collection, they did not group together in the PCA dispersion plot. Also, we did not find common genomic regions (bands) exclusively present among these virulent entomopathogenic fungi strains.

Discussion

We found high genetic diversity within the entomopathogenic fungal collection analyzed (121 polymorphic bands). The AMOVA analysis established that between-group variation (59%) was only slightly higher than within-group variation (41%) of the strains. These data suggest that the majority of groups associated by genera are probably conformed by more than one species of

the same genus. Fungal strains of most of the groups in the dendrogram showed genetic similarity indexes lower than 0.50, except for group C (*Beauveria*), E (*Metarhizium*.) and I (*Beauveria*), where strains displayed indexes above 0.50 in most cases, and even over 0.70 for some strain pairs (Fig. 2). Group C, besides being a genetically homogeneous cluster, is almost entirely constituted by *Beauveria* strains recovered from *Premnotrypes vorax*. These results resemble to those of a PCR-RAPD genotyping study of *B. bassiana* [21], where 80% of 276 bands obtained were common to all strains recovered from *Diatraea saccharalis*. In contrast, while groups A, D and F are clusters completely comprised by *Beauveria* isolates, they exhibit low genetic similarity between strains (indexes below 0.50). Specifically, group A is a genetically dissimilar cluster which encloses isolates recovered from different coleopteran hosts (*Premnotrypes vorax*, *Macridactylus*, and an unidentified Scarabid), and groups D and F are clusters conformed by genetically dissimilar isolates which share the same host of origin. The data from group A resemble the results of a study carried out using PCR-RAPD and RFLP markers [22] where high genetic dissimilarity was revealed among *B. bassiana* strains derived from different coleopteran species. The heterogeneity shown by the rest of groups of the dendrogram (constituted by *Metarhizium*, *Verticillium*, *Candida* and four un-identified strains) might explain the low genetic similarity indexes found among their strains.

In the present study, five groups (C, D, E, F and J) were associated by genus and by their host of origin; however, the existence of a strict association between a particular entomopathogenic fungal strain and the host insect of which it came from seems to be improbable. Several publications [1–3, 23, 24] have pointed out the capability of entomopathogenic fungi to exhibit cross-infectivity. Our results show some correlation between genus and host of origin, suggesting a relative ability of particular fungal strains to more easily infect certain host insects. Indeed, B030 & B031 from groups C (*Beauveria sp.*) and M005 & M010 from Group E (*Metarhizium sp.*), which turned out to be highly genetically similar, were recovered from different host insects, evidencing exceptions to this general tendency even within host-associated groups. The high genetic similarity (0.97) between isolates M005 and M010, which were obtained from distinct locations besides of coming from different hosts, is also not a rare outcome as evidenced by other reports [7, 25, 26]. The opposite phenomenon was also evidenced in this study and has been previously documented as well by other studies [21, 27]; isolates M005 and M007 which came from the same host insect (*Macrodactylus sp.* adults) and location (Alobuela, Pichincha) showed less genetic similarity between them (0.74) than other strain pairs analyzed in this study.

Similarly to what was found in this study, Poprawski et al. [7] and Mugnai et al. [8] found apparent cor-

relations between genotype and host preference using isoenzymatic markers. Other studies performed using RFLP markers and ITS region-analysis [9, 10] have also established correlations between molecular variation of *Beauveria* strains and their host range. Interestingly, Bidochka and Small (Bidochka and Small 2005 in Zimmermann 2007 [2]) concluded, based on population genetics studies, that an association of *M. anisopliae* genotypes occurs with host insect preference in tropical and subtropical regions and with habitat type in temperate and polar regions. Although almost all isolates from INIAP's collection came from Ecuadorian highlands, Ecuador is geographically located in the tropics; therefore, this conclusion seems to agree with our results. Despite these evidences, other studies have found no associations between genotype and host preference or geographic origin. For instance, Bidochka et al. [26] did not find evidence of clustering by host preference in *M. anisopliae* and *M. flavoviride* using PCR-RAPD markers. Analogously, Coates et al. [28] reported insufficient statistic evidence to correlate the BbMin1 minisatellite sequence, employed to analyze a *B. bassiana* collection, neither with host preference nor with geographic origin.

As stated earlier, the most virulent fungal strains of the collection (B018, M005 and M101) were genetically dissimilar. So far, a clear correlation between genotype and pathogenicity has not been established due to incongruous results. Several studies have found high genetic similarity among virulent isolates of the same species [9, 11, 29], whereas others have demonstrated considerable genetic variation among virulent fungal strains of the same species affecting a certain host insect [27, 30]. To explain the genetic homogeneity among certain virulent strains, some researchers have proposed virulence may be the result of minor variations of a common genotype [11]. Alternatively, others have interpreted these findings as the capacity of specific fungal genotypes to infect a particular host species [9]. In contrast, the genetic dissimilarity found among other virulent fungal isolates recovered from a particular host species has been explained as the presence of two or more infective strains living in sympatry [27]. The phylogenetic divergence found between B018 (*Beauveria*) and M005 & M101 (*Metarhizium*) is reasonably expectable because of the different taxa they belong to. However, the lack of grouping between virulent strains M005 and M101 suggests they are probably different *Metarhizium* species capable of infecting Scarabaeidae hosts, and therefore, their genomes differ considerably. Other studies [21] have reported dendrogram grouping of virulent entomopathogenic strains, hypothesizing the sharing of a genetic component related to pathogenicity among them. Our virulent isolates (B018, M005 and M101) did not share distinctive bands, and did not group together neither in the dendrogram nor in the PCA dispersion plot. These results may suggest virulence has different genetic components in each strain or maybe the technique used in our analysis could not reveal the common genomic region responsible for virulence among these strains.

A possible explanation for the grouping of B018 (*Beauveria sp.*) and C040 (*Candida sp.*) into the same cluster (Group B) is the sharing of homologous genomic regions related to their surviving capability in the Galapagos Islands' ecosystems with specific environmental conditions. Additionally, the grouping of unidentified isolates (U058, U060, U061 and U062) with two *Beauveria* strains (B015 and B107) in the dendrogram may suggest these isolates belong to the genus *Beauveria* or to another entomopathogenic genus closely related to it. Also, the genetic similarity index between M032 (*Metarhizium*) and B043 (*Beauveria*) was 0.50, suggesting a morphological identification error of B043, whose genus was suggested by INIAP to be *Beauveria*. This last observation is a possible explanation for the lack of grouping between the two *Verticillium lecanii* strains and the two *B. brongniartii* strains present in our collection. Finally, it is important to observe that the lack of correspondence among some of the results from several studies regarding phylogenetics and correlations genotype-geographic origin, genotype-host preference and genotype-virulence is probably due to the using of different DNA-analysis techniques, which may screen different genomic regions, generating diverse outcomes [31].

The results from this study demonstrate that the modified AFLP technique described in this paper was effective to evaluate the genetic diversity of the INIAP's entomopathogenic fungi collection. The technique detected high genetic diversity among the isolates and a correlation between some isolates and their host preference. The data generated in this study encourages further research on Ecuadorian native entomopathogenic fungi, where virulent genotypes that could be used in biological pest management could be found.

Acknowledgments

We thank SENACYT (Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología, Ecuador) for their financial support, and M.Sc. Patricio Gallegos (INIAP) for providing the isolates used in this study. We also want to thank Bernardo Gutiérrez for his comments and suggestions in writing this manuscript.

References

- [1] Aquino de Muro, M.; Mehta, S.; Moore, D. 2003. "The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other countries, and their correlation with host and geographical origin". *FEMS Microbiology Letters*, 229:249 – 257.
- [2] Zimmermann, G. 2007. "Review on safety of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*". *Biocontrol Science and Technology*, 17 (5/6):553 – 596.
- [3] Zimmermann, G. 2007. "Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*". *Biocontrol Science and Technology*, 17(9):879 – 920.
- [4] Wang, L.; Huang, J.; You, M.; Guan, X.; B., L. 2005. "Effects of toxins from two strains of *Verticillium lecanii* (Hyphomycetes) on bioattributes of a predatory ladybeetle, *Delphastus catalinae* (Col., Coccinellidae)". *JEN*, 129(1):32 – 38.
- [5] Zengzhi, L.; Alves, S.; Roberts, D.; Meizhen, F.; Delalibera Jr., I.; Jian-Tang, L.; Rogério, B.; Faria, M.; Rangel, D. 2010. "Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi.". *Biocontrol Science and Technology*, 20(2):117 – 136.
- [6] Mitina, G.; Mikhailova, L.; Yli-Mattila, T. 2008. "RAPD-PCR, UP-PCR and rDNA sequence analyses of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* and its pathogenicity towards insects and phytopathogenic fungi". *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 41(2).
- [7] Poprawski, T.; Riba, G.; Jones, W.; Aioun, A. 1989. "Variation in isoesterase profiles of geographical populations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolated from Sitona weevils (Coleoptera: Curculionidae)". *Environmental Entomology*, 17:275 – 279.
- [8] Magnai, L.; Bridge, P.; Evans, H. 1989. "A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*". *Mycological Research* 92: 199-209. Neueglise, C., Brygoo, Y., Vercambre, B., Riba, G. 1994. Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects". *Mycological Research*, 98:322 – 328.
- [9] Neueglise, C.; Brygoo, Y.; Vercambre, B.; Riba, G. 1994. "Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects". *Mycological Research*, 98:322 – 328.
- [10] Viaud, M.; Couteaudier, Y.; Levis, C.; Riba, G. 1996. "Genome organization in *Beauveria bassiana*: electrophoretic karyotype, gene mapping, and telomeric fingerprint". *Fungal Genetics and Biology*, 20:175 – 183.
- [11] Cravanzola, F.; Piatii, P.; Bridge, P.; Ozino, O. 1997. "Detection of genetic polymorphism by RAPD-PCR in strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii* isolated from the European cockchafer (*Melolontha spp.*)". *Letters in Applied Microbiology*, 25:289 – 294.
- [12] Landázuri, P. 2003. "Prospección y Evaluación de cepas de *Beauveria sp.* y *Metarhizium sp.* en las provincias de Carchi, Cotopaxi, Chimborazo y Cañar, para el control biológico de Gusano Blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*)". *Instituto de Postgrado-Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí-Ecuador*.
- [13] Barriga, E. 2003. "Evaluación de la Patogenicidad y Multiplicación en sustratos de aislamientos de *Beauveria brogniartii* y *Metarhizium anisopliae* para el control de *Premnotrypes vorax* en el laboratorio y campo". *Facultad de Ciencias Agrícolas-Universidad Central del Ecuador*.

- [14] Valverde, I. 2004. "Aislamiento e Identificación de Hongos Entomopatógenos y pruebas de patogenicidad en *Cosmopolita sordidus* y *Metamasius hemipterus* en condiciones de Laboratorio: San Cristóbal-Galápagos". *Facultad de Ciencias Agrícolas-Universidad Central del Ecuador. Quito-Ecuador*.
- [15] Rueda, M. 2005. "Prospección de Hongos Entomopatógenos para *Macroductylus pulchripes* Blanchard (Aguacuro del Maíz), y su comportamiento de oviposura: san José de Minas, Pichincha. Facultad de Ciencias Agrícolas". *Universidad Central del Ecuador. Quito-Ecuador*.
- [16] Ayala, O. 2006. "Determinación de agresividad de Hongos Entomopatógenos para *Macroductylus* sp. (Catzo del Maíz): Chillanes-Bolívar". *Facultad de Ciencias Agrícolas-Universidad Central del Ecuador. Quito-Ecuador*.
- [17] Shagai-Marooif, M.; Soliman, K.; Jorgensen, R.; Allard, R. 1984. "Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal locations and population dynamics". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 81:8014 – 8018.
- [18] Pfeifer, T.; Khachatourians, G. 1993. "Electrophoretic karyotype of the entomopathogenic deuteromycete *Beauveria bassiana*". *Journal of Invertebrate Pathology*, 61(3):231 – 235.
- [19] Shimizu, S.; Y., A.; T., M. 1992. "Electrophoretic karyotype of *Metarhizium anisopliae*". *Journal of Invertebrate Pathology*, 60(2):185 – 187.
- [20] Benbouza, H.; Jacquemin, J.; Baudoin, J.; G., M. 2006. "Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels". *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 10:77 – 81.
- [21] Berretta, M.; Lecuona, R.; Zandomeni, R.; Grau, O. 1998. "Genotyping isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with fluorescent labels". *Journal of Invertebrate Pathology*, 71:145 – 150.
- [22] Maurer, P.; Couteaudier, Y.; Girard, P.; Bridge, P.; Riba, G. 1997. "Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range". *Mycological Research*, 101:159 – 164.
- [23] Glare, T.; Inwood, A. 1998. "Morphological and genetic characterisation of *Beauveria* spp. from New Zealand". *Mycological Research*, 102(2):250 – 256.
- [24] Rehner, S.; Buckley, E. 2005. "A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs". *Mycologia*, 97:84 – 98.
- [25] St. Leger, R.; Allee, L.; May, B.; Staples, R.; Roberts, D. 1992. "World-wide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria* spp". *Mycological Research*, 96:1007 – 1015.
- [26] Bidochka, M.; McDonald, M.; St. Leger, R.; Roberts, D. 1994. "Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic ADN (RAPD)". *Current Genetics*, 25:107 – 113.
- [27] Urtz, B.; Rice, W. 1997. "RAPD-PCR characterization of *Beauveria bassiana* isolates from the rice water weevil *Lissorhoptrus oryzophilus*". *Letters in Applied Microbiology*, 25:405 – 409.
- [28] Coates, B.; Hellmich, R.; Lewis, L. 2002. "Allelic variation of a *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) minisatellite is independent of host range and geographic origin". *Genome*, 45:125 – 132.
- [29] Piatti, P.; Cravanzola, F.; Bridge, P.; Ozino, O. 1998. "Molecular characterization of *Beauveria brongniartii* isolates obtained from *Melolontha melolontha* in Valle d'Aosta (Italy) by RAPD-PCR". *Letters in Applied Microbiology*, 26:317 – 324.
- [30] St. Leger, R.; Screen, S.; Shams, P. 2000. "Lack of host specialization in *Aspergillus flavus*". *Applied and Environmental Microbiology*, 66:320 – 324.
- [31] Devi, K.; Reineke, A.; Nageswara Rao Reddy, N.; Maheswara Rao, C.; Padmavathi, J. 2006. "Genetic diversity, reproductive biology, and speciation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin". *Genome*, 49:495 – 504.

Diversidad de hormigas en parches de bosques secos y húmedos de Costa Rica

Cruz M. Márquez-Baltán^{1,2*}, Lady D. Márquez-Rea³ y Jefferson A. Márquez-Rea⁴

¹Av. 18 de Febrero y Marchena, Puerto Ayora, Isla Santa Cruz, Galápagos, Ecuador.

²Departamento de Conservación y Desarrollo Sustentable del Parque Nacional Galápagos.

³Lincoln University Box 85084, Lincoln 7647 Canterbury, New Zealand.

⁴Lindblad, Expedition, 96 Morton Street, 9th Floor, New York, New York 10014.

* Autor principal/Corresponding author, e-mail: cruz.marquez02@gmail.com

Editado por/Edited by: Diego Cisneros H., Ph.D.

Recibido/Received: 24/04/2013. Aceptado/Accepted: 02/06/2013.

Publicado en línea/Published on Web: 28/06/2013. Impreso/Printed: 06/06/2013.

Abstract

In The Palmar Viejo de Parrita and the patches of the successional forests of La Selva Research Station, it's been studied the ants (Hymenoptera) as a morpho-species (as a lack of taxonomic key). Systematic sampling methods were developed, using as bait to attract the ants sardines placed inside open flasks. The results showed that in The Palmar Viejo de Parrita, the Bases of the Palm trees, were more variable in matters of morpho-species of ants than it Between Four Palm trees. A greater rate of diversity was shown at the Base of the Palm trees in relationship to the samples taking in between four palm trees. The similarity and traslapping rates between the two plots of African palm trees (*Elaeis guineensis*), were closet o an average value. Nevertheless, the successional forests from La Selva are richer in ant morpho-species than The Palm trees forests found in Parrita. The most diverse forest was that one of 0-1 years old the highest similarity rate was found in the forest of 3-4 years old. The percentual traslapping rate of the patches of successional forest from La Selva, are closet o the average. Parrita and La Selva are diferent in species variability. The patches of forests found at La Selva are slightly more diverse than those of Palmar Viejo de Parrita. The similarity rates of the tree plots found at La Selva Research Station are slightly greater than those of Parrita the traslapping rates of Parrita and La Selva Research station are close to the average.

Keywords. Ants diversity, dry and humid forests, Costa Rica

Resumen

En El Palmar Viejo de Parrita y en los parches de bosques sucesionales de la Estación Biológica La Selva, se estudiaron las hormigas (Himenóptera) como morfo-especies. Métodos de muestreos sistemáticos fueron desarrollados, usando como cebo atrayente de hormigas, "Sardinas" en el interior de frascos destapados. Resultados indican que en El Palmar Viejo de Parrita, Pie de Palma, fue más variable en morfo-especies de hormigas que Entre Cuatro Palmeras. Mayor índice de diversidad presentó Pie de Palma en relación a Entre Cuatro Palmeras. Los índices de similitud y traslape entre las dos parcelas de Palma Africana (*Elaeis guineensis*), fueron cerca del valor medio. Los bosques sucesionales de La Selva, son más variables en morfo-especies de hormigas con relación a Los Palmares de Parrita. El bosque más diverso en morfo-especies de hormigas, fue el de 0-1 año. El más alto índice de similitud en morfo-especies de hormigas, fue encontrado en el bosque secundario de 3-4 años. Los índices de traslape porcentual de los parches de bosques sucesionales de La Selva, son próximos a la media. Parrita y la Selva, son diferentes en variabilidad de especies. Los parches de bosques de La Selva, son ligeramente más diversos que El Palmar Viejo de Parrita. Los índices de similitud de las tres parcelas de la Estación Biológica La Selva, son ligeramente superiores a los de Parrita. Los índices de traslape en Parrita y la Estación Biológica La Selva, fueron próximos a la media.

Palabras Clave. Diversidad de hormigas, bosques secos y húmedos, Costa Rica

Introducción

Himenóptera es uno de los grupos de insectos costarricenses medianamente conocidos a nivel taxonómico (Figura 1). La diversidad de estos insectos, está rela-

cionada con la humedad del sustrato, la estructura del bosque y la variabilidad climática [1, 2]. Las hormigas como organismos bio-ecológicos, tienen distribución cosmopolita, con excepciones de los polos y las



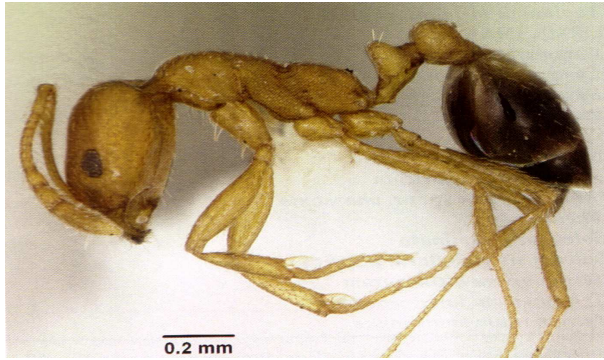


Figura 1: Morfo-especie de hormiga colectada en El Palmar Viejo de Parrita

regiones más frías y secas del planeta; como son las zonas de nevado permanente cumbres de los volcanes, nevados y montes que sobrepasan los 3000msnm [1]. En América Central, Costa Rica es uno de los países de mayor diversidad de hormigas con algunas familias, géneros y especies de amplia distribución en todo el país [3].

Parrita es un lugar relativamente seco, uniforme y de una aparente baja diversidad biológica, debido a factores físicos como el tiempo de uso científico de los palmares de Palma Africana (*Elaeis guineensis*). En La Selva, el mayor énfasis, está en las investigaciones de cómo las interacciones, incluida la sucesión de bosques, ayudan a generar la alta diversidad de especies tropicales [4]. Costa Rica entre los países centroamericano es uno de los que mantiene una amplia gama de escenarios de alta, media y baja diversidad de especies de flora y fauna; dentro de todo este contexto se incluyen la diversidad de familias, géneros y especies de hormigas en todo el país [3, 5].

En Finca La Selva, hasta 1987, se tenían cinco parches sucesionales de vegetación para experimentación, a las que se las había clasificado de acuerdo al tiempo de talados; de 0-1 hasta 4-5 años. Como también existían bosques primarios o no perturbados (nunca talados), para en el futuro efectuar comparaciones en tiempo de restauración con las anteriores, y para observar cuan rápida es la regeneración en los bosques muy húmedos, como es el caso de Finca La Selva. Por otra parte el Palmar Viejo de Parrita, es otro de los lugares usado por los estudiantes del curso de “Ecología de Poblaciones” que realizan trabajos de interacción ecológica, para lo cual son entrenados como biólogos. El trabajo aquí expuesto, es producto de este curso durante enero y febrero de 1987.

El objetivo de este trabajo fue realizar comparaciones entre lugares húmedos (Estación Biológica Finca La Selva) y secos como el Palmar Viejo de Parrita, y conocer si la diversidad de hormigas de ambos lugares, era igual o diferente; como en cualquiera de los parches de bosques sucesionales, ya fueran intervenidos o no por el hombre. Otro de los objetivos fue averiguar si la diversidad de hormigas disminuía de acuerdo a la alta o baja precipitación, como es el caso de los lugares Parrita y Finca

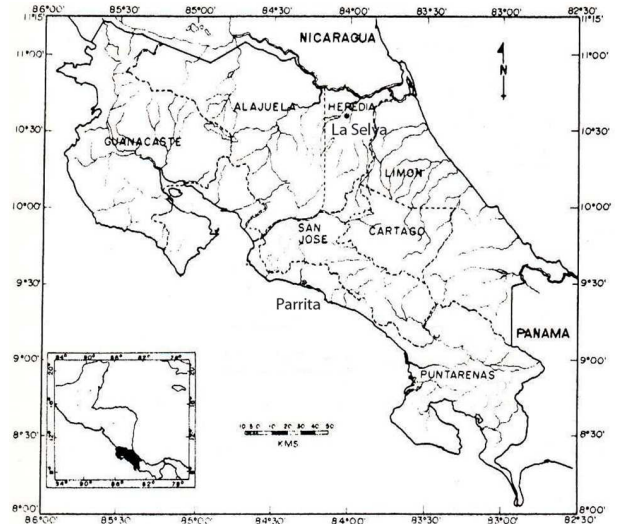


Figura 2: Ubicación de los dos lugares (Parrita y la Estación Biológica Finca La Selva), donde se realizaron los muestreos de las hormigas

La Selva; entre los dos lugares existe una gran diferencia en las condiciones climáticas y diversidad biológica [4, 5]. Trabajos como este se podrían desarrollar entre los diferentes escenarios de bosques secos y húmedos del Ecuador, como uno de los países mega diverso de Sudamérica.

Metología

Área de estudio

El clima en la zona y pueblo de Parrita es seco <700 mm de precipitación anual y rodeada de parcelas de frijoles y palma africana (*E. guineensis*), bosque intervenido en su totalidad. Mientras que en la Estación Biológica La Selva, son bosques húmedos y muy húmedos >3000 mm de precipitación promedio anual y mantiene bosques primarios y secundarios experimentales [3, 4].

Este estudio se desarrolló en una zona ubicada entre El Palmar Viejo de Parrita (9°31' 17,26" N y 84°19' 40,98" O.) del 13 al 14 de enero de 1987 y en la Estación Biológica La Selva (10°25' 58,74" N y 83°59' 31,50" O.) del 20 al 21 de Febrero del mismo año (Figura 2).

En El Palmar Viejo de Parrita, cebos fueron colocados en pie de palma, (dos filas, 20 palmeras) y Entre Cuatro Palmas, para lo cual, se usaron cuatro filas de palmas y para colocar los cebos se tomó como relación los puntos equidistantes entre las cuatro palmeras. Como cebo atrayente de hormigas, tanto en Parrita como en Finca La Selva, se usó sardina, de la que se tomaron pequeños pedazos y fueron colocados en el interior de los frascos destapados, 20 para cada sitio. La colocación y levantamiento de los cebos en los lugares de estudio, se efectuó desde las 9h10 hasta las 10h10, luego, se procedió a tapar, recoger los frascos y trasladarlos al laboratorio.

Los tres parches de bosques de Finca La Selva, uno denominado primario o no intervenido por el hombre y

# especie	Palmares Viejos de Parrita*		Bosques Sucesionales de la E. B. Selva		
	C.V.(%) 4P.	C.V.(%) Pie P.	B.P. (%)	BS-0 a 1 año	BS-3 a 4 años
1	54,5*	39,0	77,0*	52,5*	52,0*
2	14,9			39,0	0,0
3					
4		49,0	78,0*	63,0*	78,0*
5	0,0	0,0	68,0*	53,0*	
6			78,0*		
7		84,0*	78,0*		
8			0,0	59,0*	0,0
9		78,6*		0,0	
10		68,7*	0,0		
11	49,0	16,0		68,0*	0,0
12					
13					
14				67,0*	
15					

*En Parrita Entre Cuatro y Pie de Palma, estuvieron cuatro de las siete especies agrupadas. En los tres parches de bosques, de la Estación Biológica Finca La Selva, las ocho especies estuvieron agrupadas. (4P = Entre Cuatro Palma; Pie P = Pie de Palma; *=Agrupadas)

Tabla 1: Coeficientes de Variación (C.V.) de morfo-especies de hormigas en el Palmar Viejo de Parrita y de los bosques sucesionales de la Estación Biológica La Selva

dos secundarios (perturbados), con diferentes tiempos de talados (de 0 a 1 y el otro de 3 a 4 años). Se tomaron estos tres diferentes tipos de bosques, para compararlos con los dos de los palmares viejos de Parrita y el parche de bosque no intervenido se lo uso como control. En los mencionados parches de bosques, también se usaron 20 frascos destapados conteniendo el mismo cebo antes indicado, y fueron expuestos desde las (9h10-10h10), luego fueron tapados, recogidos y trasladados al laboratorio, donde fueron separadas por grupos.

Es importante indicar que se decidió trabajar a nivel de morfo-especies, por falta de clave taxonómica precisas para la identificación de cada una de las especies de hormigas presentes en las muestras.

Análisis de los datos

Para observar cuan variables en morfo-especies de hormigas, eran las dos parcelas en Parrita y las de la Estación Biológica La Selva, se uso el coeficiente de variación (C. V.). Para conocer la gran diversidad en morfo-especies de hormigas de las parcelas (BS = Bosque Secundarios) y sin perturbación (BP = Bosque Primario o control), se uso el índice de diversidad de [6]. Para determinar semejanzas en morfo-especies de hormigas entre las dos parcelas, se uso el índice de similitud de [7] (Tabla 3). Para observar si existía traslape de nicho en número de morfo-especies de hormigas entre los dos parches de bosques de Parrita vs La Selva, se uso el Cociente de Comunidad o Traslape Porcentual de [8]. Se uso el paquete estadístico SPSS, para correr las pruebas de ANOVA, Chi-Cuadrado y U de Mann Whitney, para la comparación de la diversidad entre los dos ambientes, y las especies compartidas entre los dos (el BP y los BS) de Finca La Selva y el palmar viejo de Parrita [9].

Resultados

El Palmar Viejo de Parrita

A) Entre Cuatro Palmas, en 13 de los 20 frascos estuvieron presentes solamente cuatro morfo-especies de hormigas lo que representa el 65 %. B) En Pie de Palma, de las 20 muestras, 16 estuvieron con el insecto en estudio (80 %), y se cuantificaron siete especies entre las dos parcelas ($D = 0,84$). Los coeficientes de variación se ubicaron entre agrupadas y dispersas (C.V. = 14.9-84.0 %) (Tabla 1). No se encontró diferencia estadística en el número de morfo-especies entre los dos tratamientos, ($U_9 = 28$; $P > 0,05$). El índice de diversidad fue ($D = 0,68$), para las muestras al Pie de Palma ($D = 0,51$) y Entre Cuatro Palmeras. El grado de similitud en morfo-especies, Entre Pie y Cuatro Palma fue ($S_{AB} = 0,54$). El índice de traslape de nicho entre ambos lugares fue $C_{XY} = 0,36$ o el 36 % (Tablas 2, 3 y 4).

Bosques Primario y Sucesionales de la Estación Biológica Finca La Selva

En la Estación Biológica La Selva, ocho morfo-especies de hormigas ($D = 0,88$) fueron cuantificadas entre los tres parches de bosques que se realizo el muestreo.

Bosque Primario (BP; Control) En el parche de bosque primario (BP), de los 20 frascos colocados, en 9 de ellos, se encontraron cinco diferentes-especies de hormigas (45 %). Los insectos en estudio, presentaron coeficientes de variación (C. V. = 68-78 %; Tabla 1). En el bosque primario, la diversidad de hormigas fue ($D = 0,52$). El Índice de similitud entre BP vs BS (0-1 año; fue $S_{AB} = 0,67$); y entre el BP vs BS (3-4 años; fue $S_{AB} = 0,72$). El BP, tuvo un bajo traslape en morfo-especies de hormigas con los Bosques de 0-1 y 3-4 años ($C_{XY} =$

Lugares	Parrita	BP	BS (0-1 año)	BS (3-4 años)	La Selva
I. D.	0,68	0,52	0,74	0,34	0,71

Tabla 2: Índices de diversidad (I.D.) de morfo-especies de hormigas en Parrita y en los tres parches de bosques de la Estación Biológica La Selva

Lugares	Parrita	BP vs BS (0-1año)	BP vs BS (3-4años)	BS (0-1 vs 3-4años)	Parrita vs La Selva
I. Similitud (S_{AB})	0,54	0,50	0,67	0,72	0,78

Tabla 3: Índices de similitud (I.S.) de morfo-especies de hormigas en Parrita y en los tres parches de bosques de la Estación Biológica La Selva

Lugares	Parrita	BP vs BS (0-1año)	BP vs BS (3-4años)	BS (0-1 vs 3-4 años)	Parrita vs La Selva
I. Traslape (C_{XY})	0,36	0,37	0,48	0,65	0,46

Tabla 4: Índices de traslape (I.T.) de nicho de las morfo-especies de hormigas en El Palmar Viejo de Parrita y en los diferentes parches de bosques sucesionales de la Estación Biológica La Selva

0,37 o el 37 %; 0,48 o el 48 % respectivamente; Tablas 2, 3 y 4). El bosque primario presento dos morfo-especie de hormigas únicas del lugar.

Bosque Secundario (BS, 0-1 año) En este parche de Bosque, de los 20 frascos, 16 (80 %), tuvieron del insecto en estudio y se determino seis morfo-especies de hormigas. Los coeficientes de variación fueron (C.V. = 39-68,0 %; Tabla 1), la mayoría se encontraban agrupadas; excepto una especie. En este bosque, se dio la más alta diversidad ($D = 0,74$). El más alto índice de similitud, se dio entre los BS de 0-1 vs 3-4 años ($S_{AB} = 0,72$). El más alto traslape de nicho en morfo-especie de hormigas, también ocurrió en los mismos bosques secundarios antes indicados ($C_{XY} = 0,65$ o el 65 %; Tablas 2, 3 y 4).

Bosque Secundario (BS, 3-4 años) En los 20 frascos expuestos, en ocho de ellos, correspondiente al (40 %), se encontraron cinco morfo-especies del insecto en estudio. Las especies presentes en este bosque estuvieron más dispersas (3 spp) y agrupadas (2 spp.); el coeficiente de variación se ubico entre (C.V. = 52-78 %; Tabla 1). La diversidad fue baja ($D = 0,34$) y similar con BS 0-1 año ($S_{AB} = 0,72$). Los dos bosques secundarios, compartieron ($C_{XY} = 0,65$ o el 65 %; Tablas 2, 3 y 4).

Comparación entre los sitios (palmar viejo de Parrita vs los parches de bosques sucesionales de la Estación Biológica La Selva)

El palmar viejo de Parrita vs los dos parches de bosques de la Estación Biológica La Selva, presentaron coeficientes promedios de variación ligeramente diferentes (C.V. = 50 y 65 % respectivamente; Tabla 1), y la mayoría de las morfo-especies estuvieron agrupadas. En los índices de diversidad, ambos bosques fueron ligeramente diferentes; Parrita presento ($D = 0,84$); mientras que en la Estación Biológica La Selva, fue ($D = 0,88$). Los promedios de la abundancia de las morfo-especies de hormigas entre La Selva y el Palmar Viejo de Parrita, no fueron diferentes ($F_{1,47} = 1,222$, g. l. = 13; $P > 0,25$). Los índices de diversidad en morfo-especies de hormigas entre Finca La Selva y el palmar viejo de Parrita, tampoco fueron diferentes ($F_{1,47} = 1,232$, g. l. = 13; $P > 0,25$). En el número de morfo-especies entre los sitios de muestreo tanto de la Estación Biológica La Selva

como el Palmar Viejo de Parrita no fueron diferentes ($X^2_{8,09} = 7,87$; g. l. = 24; $P > 0,99$). Los índices de similitud entre el Palmar Viejo de Parrita vs La Selva fue ($S_{AB} = 0,52$) y compartieron cuatro especies de hormigas ($C_{XY} = 0,48$ o el 48 %; Tablas 2, 3 y 4).

La comparación estadística entre los parches de bosques de Finca la Selva en número de especies no fueron diferentes ($F_{5,83} = 1,03$; g. l. = 1; $P > 0,50$); entre los sitios y tratamientos tampoco hubo diferencia ($F_{5,83} = 1,28$; g.l. = 1; $P > 0,30$). Los tratamientos entre ellos, igualmente no presentaron diferencias ($F_{5,83} = 1,11$; g. l. = 1; $P > 0,48$). La intersección entre los parches de bosques y sitios no fue diferente ($F_{5,83} = 1,27$; g. l. = 1; $P > 0,54$). Entre tratamientos y especies no presentaron diferencias ($F_{5,83} = 0,000$; g. l. = 1; $P > 0,99$).

Discusión

En base de los resultados obtenidos, se infiere que los frascos sin hormigas en todos los parches de bosques que se realizó el muestreo; tanto en la Estación Biológica La Selva como en El Palmar Viejo de Parrita, se debe a (1) que coincidieron colocarse en lugares donde no habían galerías de hormigas, (2) ausencia de nidos cercanos (3) que el cebo no era el adecuado. (4) El alto índice de diversidad en pie de palma se debe a la ausencia de *Solenopsis* sp. (Hormiga de fuego); mientras que el mediano índice de diversidad entre cuatro palma, está relacionado con la frecuencia extrema de *Solenopsis* sp en la mayoría de las muestras. Cabe mencionar que *Solenopsis*, es una especie de hormiga muy agresiva, territorial y depredadora; donde ella habita, disminuyen otras especies de insectos incluida otras especies de hormigas [10–12]. También es una especie cosmopolita y relacionada con el hombre; ella para trasladarse en ocasiones lo hace en ciertos animales, equipajes que el hombre utiliza en su traslado y en balsillas de madera en los ríos [13, 14].

En el Palmar Viejo de Parrita, Entre Cuatro y Pie de Palma, cuatro de las siete especies estuvieron agrupadas, correspondiente al 57 % del total de las especies en los dos parches, las remanentes morfo-especies, estuvieron dispersas. Parrita es un bosque seco y sumamente intervenido. Mientras que en los dos parches de bosques

sucesionales de la Estación Biológica La Selva, siete estuvieron agrupadas, el 88 % del total de especies, y los parches de bosques de La Selva, se ubican en una zona muy húmeda de Costa Rica. En el primer caso (Parrita, bosque seco), las hormigas deben dispersarse para conseguir agua y alimento disponible [5, 10, 15]. En el segundo caso (bosques sucesionales de la Estación Biológica La Selva, es una zona muy húmeda, las hormigas no requieren de una mayor dispersión para encontrar agua y alimento, bosques húmedos mantienen una alta diversidad de invertebrados, que son presa disponible para las hormigas [16, 17].

En las dos parcelas analizadas en El Palmar Viejo de Parrita, la diversidad de hormigas fue ligeramente inferior a la observada en las dos parcelas de bosque intervenido de la Estación Biológica La Selva. Esto indica que en La Selva, los parches de bosques perturbados, son diferentes a las de El Palmar Viejo de Parrita, por la exuberancia de la vegetación asociada al clima, la humedad, y con ello, la disponibilidad de alimento. Bosques muy húmedos presentan mayor afloramiento de morfo-especies de hormigas; bosques secos plantean generalmente bajo afloramiento de hormigas [1, 6, 11]. Entre los parches de bosques que se realizó el muestreo en Finca La Selva, el bosque que presento mayor diversidad en morfo-especies de hormigas, es el de 0-1 año. Esto puede deberse a que en el mencionado bosque durante el día, ocurre más radiación solar, por la poca cobertura y altura de la vegetación circundante, por ello lo frecuentan mayor cantidad de insectos, mientras que no ocurre así, en bosques con altura y cobertura mayor. Los otros dos bosques remanentes son también diversos en morfo-especies de hormigas; pero con valores ligeramente inferior.

En El Palmar Viejo de Parrita, los índices de similitud entre las dos parcelas, son inferior a los ocurridos en las parcelas de la Estación Biológica La Selva; pero entre Parrita vs. La Selva el índice de similitud fue mayor de 0,50; los dos lugares son ligeramente similares en morfo-especies de hormigas. Bosques secos son menos similares a los muy húmedos; especies de bosques secos son particulares de ese ambiente como también las de bosque muy húmedo [11]. La sucesión de bosques genera alta similitud entre los parches sucesionales en una determinada área, donde se trata con bosques experimentales [15]. Los bosques primario (control) y secundario de 3-4 años, fueron semejantes en morfo-especies de hormigas. El número de especies de hormigas de la Estación Biológica La Selva, son ligeramente similares con las encontradas en Parrita; posiblemente esto se debe a que algunas especies del insecto en estudio podrían ser cosmopolitas, distribuyen indistintamente sin que importe las condiciones climáticas del país.

Entre las parcelas de El Palmar Viejo de Parrita vs las parcelas de la Estación Biológica La Selva, los valores de los índices de traslape son próximos a la media. Probablemente están relacionados con la distancia geográfica, donde se ubican los dos lugares en estudio. Se an-

ota que los bosques secos altamente intervenidos ofrecen bajos traslapes con bosques muy húmedos [8]. Lo que podría estar relacionado con la distancia, en que se encuentra Parrita (Bosque seco) con relación a las parcelas sucesionales de la Estación Biológica La Selva (Bosque muy húmedo). El porcentaje más alto en traslape de nicho en morfo-especies, lo muestran los bosques secundarios de 0-1 y de 3-4 años. Mientras tanto que en los demás parches de bosques, las especies están en menor grado porcentual traslapadas con otros bosques. Los bosques intervenidos como el no perturbado (control) de la Estación Biológica La Selva, compartieron con El Palmar Viejo de Parrita cinco morfo-especies de hormigas de ocho y siete registradas en las muestras; la distancia entre Parrita y La Selva son aproximadamente 120 Km en línea recta. Por consiguiente el traslape de especies entre los dos sitios de muestreo es más que el 50 %.

Conclusiones

En el Palmar Viejo de Parrita, Pie de Palma, fue más variable en morfo-especies de hormigas que Entre Cuatro Palma. Mayor índice de diversidad presento Pie de Palma en relación a Entre Cuatro Palmeras. Los índices de similitud y traslape entre las dos parcelas de Palma Africana, fueron cerca al valor medio.

Los bosques sucesionales de la Estación Biológica Finca La Selva, son más variables en morfo-especies de hormigas. El bosque más diverso en morfo-especies de hormigas fue el de 0-1 año. El más alto índice de similitud en morfo-especies de hormigas, fue encontrado en el bosque secundario de 3-4 años. Los índices de traslape porcentual de los parches de bosques sucesionales de la Estación Biológica Finca La Selva, son próximos a la media.

Parrita y la Selva, son diferentes en variabilidad de especies. Los parches de bosques de La Selva, son ligeramente más diversos que El Palmar Viejo de Parrita. Los índices de similitud de las parcelas de la Estación Biológica Finca La Selva son ligeramente superiores a los de Parrita. Los índices de traslape en ambos lugares, son próximos a la media.

Agradecimientos

Nuestra sincera gratitud a la Organización de Estudios Tropicales (OET), Universidad de Costa Rica (UCR) al Instituto Tecnológico de Cartago (ITC), por haberle proporcionado la beca y apoyo al autor de este documento. Al Dr. Gunther Reck Director de la Estación Científica Charles Darwin por su apoyo en permitir la participación del autor en el curso de Ecología de Poblaciones I y II. A cada uno de los profesores del curso "Ecología de Poblaciones 87-2" que siempre apoyaron con su asesamiento a los participantes; en especial al coordinador Gary Style por su especial apoyo en la preparación de los informes.

Referencias

- [1] Young, A. 1982. "The population biology of tropical insects". *Plenum, N.Y.*
- [2] Golley, F. 1983. "Tropical Rain Forests Ecosystems, Structure and Function". *Elsevier, Nueva York.*
- [3] Valerio, C. 1991. "La diversidad Biológica de Costa Rica". *Impreso en Costa Rica. Por Varitec S.A.*
- [4] Janzen, D. 1991. "Historia Natural de Costa Rica". *Editorial de la Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica.*
- [5] Holdridge, L. 1947. "Determination of World plant formation from simple climatic data". *Science*, 105:367 – 368.
- [6] Sorensen, T. 1948. "A method of Establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application to analyses of the vegetation on Danish commons". *Danish Vidensk. Selsk. Biol. Skr*, 5:1 – 34.
- [7] Brillouin, L. 1962. "Science and Information Theory". *Academic Press, New York.*
- [8] Morisita, M. 1962. "Id-index, a measure of dispersion of individuals". *Researches in Population Ecology*, 4:1 – 7.
- [9] Zar, J. 1999. "Biostatistical Analysis". *4th Edition, Prentice-Hall, London.*
- [10] Meier, R. 1985. "Interference Behavior of Two Tramp Ants (Hymenoptera Formicidae) at Protein Baits on the Galápagos Islands, Ecuador". *Experientia*, 41(9):1228 – 1229.
- [11] Williams, D.; Whelan, P. 1991. "Polygynous colonies of *Solenopsis geminata*: (Hymenoptera: Formicidae) in the Galápagos Islands". *Florida Entomologist*, 74:368 – 371.
- [12] Herrera, H.; Causton, C. 2010. "First inventory of ants (Hymenoptera: Formicidae) On Baltra Island, Galápagos". *Galápagos Research*, 67:13 – 17.
- [13] Meier, R. 1986. "Patrones de Coexistencia y Comportamiento Alimenticio de Hormigas Dentro de la Zona Árida de Tres Islas". *Infor. Anual ECChD*, 23 – 28.
- [14] Ehrlich, A.; Ehrlich, P. 1978. "Reproductive strategies in the butterflies. I. Mating frequency, plugging, and eggs number". *J. Kans. Ent. Soc*, 51:666 – 697.
- [15] Harcombe, P. 1980. "Soil nutrients as a factor in early Tropical secondary Succession". *Biotropica*, 12(2):8 – 15.
- [16] Hartshorn, G. 1972. "The Ecological life history and population dynamics of *Pentaclethra macroloba*, a tropical wet forest dominant and *Stryphnodendron excelsum*, an occasional associate". *Ph.D. Dissertation., University of Washington.*
- [17] Holdridge, L. 1987. "Ecología basada en zonas de vida". *Publicado por IICA. San José Costa Rica.*

Evaluación y manejo de fuentes semilleras de Teca (*Tectona grandis* Linn. f.) en la Estación Experimental Tropical Pichilingue, Ecuador

Álvaro Cañadas^{1*}, Diana Rade¹, Carlos Zambrano², Carlos Molina² y Luis Arce²

¹Universidad Técnica del Norte, Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales

¹Av. 17 de Julio 5-21 y José Córdova, Ibarra, Ecuador

²Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, INIAP, Estación Experimental Tropical Pichilingue (EETP)

²Vía Quevedo-El Empalme Km 5,5, Ecuador

*Autor para correspondencia, correo electrónico: alvarogustavo.canadaslopez@alumni.uni-goettingen.de

Editado por/Edited by: Diego Cisneros H., Ph.D.

Recibido/Received: 11/02/2013. Aceptado/Accepted: 30/05/2013.

Publicado en línea/Published on Web: 28/06/2013. Impreso/Printed: 06/06/2013.

Abstract

There has not been performed any kind of evaluation of the plantations of Teak to this date at the Tropical Experimental Research Station Pichilingue of INIAP (EETP-INIAP) in order to determine the particular characteristics of these stands; as well as the objective of putting to use the production of seeds as aim to carry out article 9 of the Normative of Forest Seeds. This current study is focussed on collecting information that can be utilized to select a suitable and efficient action plan to implement in the usage as well as the administration of the plantations. The obtained data in this investigation demonstrate that the methodology proposed to evaluation of quality and assessment of forest plantations, and was applied on 2570 Teak trees, is of little suitable. This is due to the fact that 46 % of the variables are not relevant or useful to the characterisation of the phenotypes of the Teak trees and this has direct incidence to costs and effectiveness of the method. Currently the effect of the influence of location quality in relation to the specific phenotypically characteristics of Teak, is being studied where the new methodology is being proposed to facilitate the characterisation of the phenology of Teak. In this study the relative spacing index (NG) fluctuate between 1,32 and 1,48, which means that all of the forest stand would be lowly heavily thinned. With this treatment all of the forest stands of the EETP-INIAP would belong to the category of Source of Collected Seeds. The maximum heights obtained between 27,01; 26,52; 23,78; and 22,60 m, the age being 25 years and a growth between 6 and 9 m³ ha⁻¹ per year demonstrate that the EETP-INIAP is an excellent place for the growth of Teak trees.

Keywords. Multivariate Analysis, Water Balance, Phenotypical Characteristic, Thinning Intensity, Weibull Function

Resumen

La principal fuente semillera de teca (*Tectona grandis*) del Ecuador se encuentra en la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP (EETP-INIAP). El presente estudio puede ser empleado para escoger apropiadamente un plan eficiente de acciones para plantaciones de teca, con el propósito de cumplir con el artículo 9 de la Normativa de Semillas Forestales del Ministerio del Ambiente del Ecuador (MAE). Los datos obtenidos demuestran que, aplicando la metodología propuesta por varios autores para medir la calidad de plantaciones en la evaluación de calidad y valoración de plantaciones forestales en el Ecuador y aplicada a 2570 árboles de teca de la EETP-INIAP es de baja adaptación, debido a que un 46 % de las variables no son relevantes y útiles para la caracterización fenotípica de las mismas, lo cual tiene directa incidencia en costos y eficacia del método. Actualmente se está estudiando los efectos de la influencia de las calidades de sitio sobre las características fenotípicas específicas de la teca y se presenta una nueva metodología para la caracterización fenológica de la teca. En este estudio, el índice de tipo de raleo (NG) fluctúa entre 1,32 y 1,48, de ahí que éstos serían ligeramente raleados. Con este tratamiento, todos los rodales de la EETP pertenecerían a la categoría de Fuente Semillera Seleccionada. Las alturas máximas obtenidas de 27,01; 26,52; 23,78 y 22,60 m, a la edad de 25 años y crecimientos entre 6 a 9 m³ ha⁻¹ año. Esto datos demuestran que, la EETP-INIAP es un excelente lugar para el crecimiento de la teca.

Palabras Clave. Análisis Multivariado, Balance Hídrico, Características Fenotípicas, Intensidad de Raleo, Función Weibull

Introducción

En el Ecuador de acuerdo a SENPLADES, el sector forestal y la reforestación son considerados como prioridad para el Estado. Así, el MAE, 2005 reporta que, las tierras con potencial para ser reforestadas alcanzan una extensión de más de 2 millones de hectáreas, concluyéndose la evidente potencialidad productiva forestal del Ecuador, en términos de ventajas comparativas, que no está siendo debidamente utilizada. Concomitantemente con esto, se están creando varios programas para promover plantaciones forestales productivas, establecer sistemas agro-silvopastoriles y plantaciones de protección, con la finalidad de recuperar áreas degradadas y al mismo tiempo generar fuentes de ingreso para los productores, a través de la producción forestal. Como ejemplos se pueden mencionar: 1) el Plan Nacional de Reforestación creado en el 2005 en el Perú que pretende establecer cerca de 900000 ha. de plantaciones comerciales y de protección ambiental; 2) el gobierno del Pará, Brasil a través del Programa “Un Billón de Árboles” procura incentivar a 120 mil productores familiares para que planten especies forestales. El Plan Forestal del MAGAP en el Ecuador incentiva a productores familiares para que establezcan 1'000000 ha., de plantaciones sociales y sistemas agroforestales en 20 años [1]. El criterio de selección de especies para la producción de madera ha sido mayormente dirigido hacia especies que asignan una mayor proporción de biomasa para suministro de madera y tener un fuerte control de crecimiento apical [2]. De ahí que, el 85 % de las plantaciones forestales en los trópicos han sido establecidas especialmente con únicamente tres géneros: *Pinus*, *Eucalyptus* y *Tectona* [3]. Para el año de 1999, existió una estimación de entre 8 a 11,1 millones de hectáreas reforestadas en Latino América, la mayoría de las plantaciones se ha realizado con especies con altos niveles de crecimiento, no nativas como las especies *Pinus* y *Eucalyptus* para la extracción de madera [4]. Para el 2004, Evans y Turnbull [2] resaltan que, las plantaciones forestales en América Latina se han concentrado en muy pocas especies exóticas, pero muy bien conocidas. Por ejemplo, *Tectonagrandis*, *Acacia sp.* y *Eucalyptussp* representaron más del 51 % del total de las reforestaciones realizadas en el Neotrópico [5]. De acuerdo a Pérez y Kanninen [6] en Costa Rica como en otros países, la mayoría de plantaciones de teca no han alcanzado las expectativas productivas. Entre las principales causas se puede mencionar a la inapropiada selección de sitio, utilización de un pobre material genético de plantación y una falta de un manejo silvicultural apropiado. No obstante, la teca (*Tectonagrandis* L.) ha sido una de las principales especies para aprovechar las oportunidades de inversión debido a su alta calidad de madera y excelente rendimiento en crecimiento [7]. CORMADERA/OIMT 2001 reporta que, la teca en el Ecuador fue introducida al país hace más de 50 años, siendo la provincia de Los Ríos uno de los nichos de adaptación y desarrollo de esta especie, por lo que se convirtió en la princi-

pal fuente de semillas para el establecimiento de plantaciones comerciales de esta madera exótica en el país. Aunque la actividad forestal se ha incrementado en los últimos años, no se ha dado énfasis a la calidad del material reproductivo que se está utilizando, especialmente para optimizar su potencial de producción. De acuerdo a CORMADERA/OIMT 2001, la principal fuente semillera de teca que se ha utilizado en el Ecuador se encuentra en la Estación Experimental Tropical Pichilingue (EETP) perteneciente al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), ubicada en el Cantón Quevedo, Provincia de Los Ríos. En relación a este tema, en febrero del 2004, el MAE expidió la normativa sobre semillas forestales, con la finalidad de: definir indicadores mínimos para la producción de semillas forestales; establecer mecanismos para la comercialización de semillas de calidad física y fisiológica razonablemente aceptables; establecer un registro de fuentes semilleras, productores, comerciantes e inspectores de semillas forestales; crear un banco de datos de semillas forestales, que permita identificar las mejores progenies según las especies; determinar un mecanismo de supervisión del manejo de semillas forestales; establecer condiciones de comercialización de semillas forestales acordes con la Política Forestal del Estado.

Hasta la presente fecha, en la EETP del INIAP no se ha realizado ninguna evaluación de las plantaciones de teca para determinar las características particulares de estos rodales con fines de darles un manejo para la producción de semillas, con el propósito de cumplir con el artículo 9 de la Normativa de Semillas Forestales. El presente estudio se enfoca en la calidad fenotípica de los árboles y tiene como objetivos específicos evaluar cualitativamente y establecer la forma de manejo de los rodales de teca, información que se usará para escoger apropiadamente un plan eficiente de acciones a llevar a cabo en las plantaciones del INIAP Pichilingue.

Métodos

Características del área de estudio

La Estación Experimental Tropical Pichilingue (EETP) del INIAP está ubicada en el km 5,5 de la vía Quevedo–El Empalme en la Provincia de Los Ríos (79°21' W, 1°06' S, altitud 120 m), presenta una temperatura promedio anual de 24°C, acogiendo a una heliofanía de 898,2 horas luz/año y recibe una precipitación media anual de 2000 mm/año y su distribución en el año se presenta en la Figura 1.

Pertenece a la formación ecológica de Bosque Húmedo Tropical [8]. Para determinar los valores del potencial de evapotranspiración se tomaron la serie de datos comprendidos entre el 2004 al 2008 del INAMHI sobre precipitación, presión de saturación de vapor de agua y humedad relativa. Con esta información, se desarrolló un modelo que permite predecir los valores de eva-

Variables específicas	Características fenotípicas	Tipo de Variable
Posición Sociológica	Dominante	1 = Si, 0 = No
	Co dominante	1 = Si, 0 = No
	Intermedio	1 = Si, 0 = No
	Suprimido	1 = Si, 0 = No
Bifurcación o reiteración (hc: altura comercial)	a 10 metros o mas	1 = Si, 0 = No
	a 7,5 metros	1 = Si, 0 = No
	a 5 metros	1 = Si, 0 = No
	a 2,5 metros	1 = Si, 0 = No
Inclinación	Recto: <30°	1 = Si, 0 = No
	Inclinado: >30°	1 = Si, 0 = No
Rectitud de fuste	Recto	1 = Si, 0 = No
	Torcedura leve <0,05 m del eje	1 = Si, 0 = No
	Torcedura aguda >0,05 m del eje	1 = Si, 0 = No
	Torcido en dos planos o más	1 = Si, 0 = No
Fito sanidad	Totalmente sano	1 = Si, 0 = No
	Aceptablemente sano	1 = Si, 0 = No
	Enfermo	1 = Si, 0 = No
Grosor y ángulo de inserción de ramas	Finas entre 90° y 60°	1 = Si, 0 = No
	Gruesas mayor a 60°	1 = Si, 0 = No
Gambas o aletones	Ausencia	1 = Si, 0 = No
	Presencia	1 = Si, 0 = No
Grano en espiral	Ausencia	1 = Si, 0 = No
	Presencia	1 = Si, 0 = No
Auto poda (Ausencia de ramas o nudos)	Ausencia de ramas en las 4 trozas	1 = Si, 0 = No
	En las 3 primeras	1 = Si, 0 = No
	En las 2 primeras	1 = Si, 0 = No
	En la primera	1 = Si, 0 = No
Dasonométricas	Diámetro	Numérica
	Altura	Numérica

Tabla 1: Evaluación de calidad y estimación del valor en pie de las plantaciones de teca de la EETP-INIAP, provincia de Los Ríos, Ecuador.

potranspiración para el año 2012, el cual se describe a continuación:

$$PET = 20,57 \times Es \times (1 - HR/100) \quad (1)$$

Donde:

PET = Evapotranspiración (mm/mes)

Es = Presión de saturación de vapor (m bar)

HR = Humedad relativa

Las bondades de ajuste de dicho modelo presentó un coeficiente de correlación de 0,84 ($p < 0,0001$) y las distribución de residuos entre los valores medidos y predichos por el modelo no presentan ninguna tendencia (Figura 1 abajo). El modelo sobre y subestima 15 mm por mes. Lo cual le confiere a este modelo gran confiabilidad para predecir los valores del potencial de evapotranspiración en la zona de influencia de la estación Pichilingue. De acuerdo al balance hídrico, los meses que presentan un déficit de hídrico son Junio, Julio, Agosto y Noviembre (Figura 1).

Ubicación de los rodales de Teca

La superficie total de los rodales de teca analizados en el presente estudio fue de 0,048 km², los cuales están divididos en cuatro rodales.

Variabes evaluadas

Entre Enero y Junio del 2006, se realizó un censo total de la población de árboles de los 4 rodales, con un total de 2566 árboles. Las variables resumidas en la Tabla 1 fueron registradas de acuerdo a la metodología propuesta por Murillo y Badilla [9]. Para la medición de la altura comercial se utilizó una pistola A AGA escala 1:20.

Análisis de las características fenotípicas de los árboles

Para cada una de las 30 variables, se calcularon estadísticas descriptivas. Se realizaron comparaciones de medias entre las zonas mediante pruebas de t para variables cuantitativas y análisis de contingencia para las cualitativas.

Análisis de componentes principales

Para reducir el número de variables y encontrar aquellas de mayor peso, se hizo un análisis de componentes principales, realizando una rotación de ejes tipo varimax e identificando correlaciones entre las variables de los componentes y luego seleccionando los que tenían valor propio mayor a uno [10].

Análisis de conglomerados y canónico discriminante

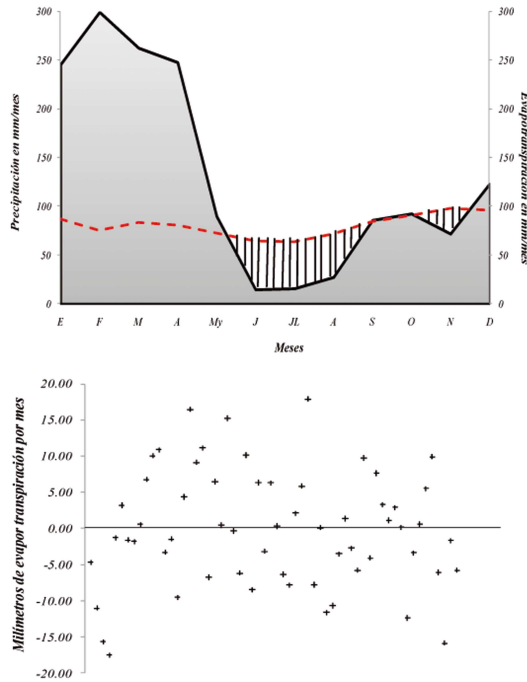


Figura 1: Distribución pluviométrica y evapotranspiración (línea roja) de la estación climatológica Pichilingue (Arriba: zona achurada representa los meses de déficit hídrico) y bondades de ajuste del modelo de predicción del Potencial de Evapotranspiración (Abajo: Distribución de residuos entre valores observados y predichos por el modelo)

Para agrupar los árboles con características similares se hizo un análisis de conglomerados con las variables involucradas. Se midieron las distancias entre cada par de observaciones con el método de Gower, que permite trabajar con diferentes tipos de variables y las estandariza según su rango [10, 11]. Con la matriz de distancias generada, se hizo el análisis de conglomerados usando el método de varianza mínima de Ward y la prueba de pseudo t^2 para elegir el número adecuado de estos. Se realizó un análisis canónico discriminante, para encontrar las variables causantes de la conformación de los grupos y se calculó la distancia entre las combinaciones de pares de estos para observar similitudes, usando la prueba de Wilk's Lambda para probar la hipótesis que eran diferentes. Estos análisis fueron aplicados con el programa SPSS versión 15 para Windows.

Descripción del tipo de Raleo

Con la finalidad de determinar la intensidad de los raleos a realizarse, el índice de espaciamiento relativo (RS) fue utilizado, el cual es calculado relacionando el número de árboles (N) y la altura dominante (H_o).

$$RS = \frac{\sqrt{\frac{1000}{N}}}{H_o} \quad (2)$$

El raleo puede ser descrito con la ayuda de la relación árboles-área basimétrica y es conocida como NG [12] y se expresa de la siguiente forma:

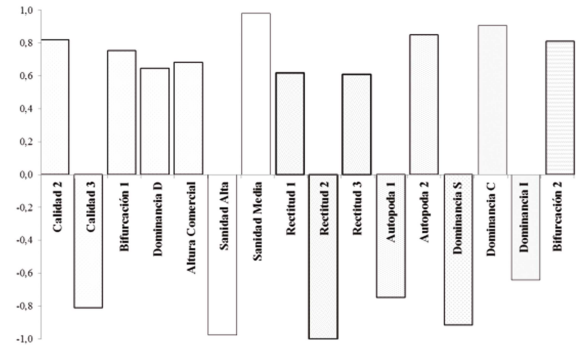


Figura 2: Representación gráfica de los resultados del análisis de componentes principales de 16 variables seleccionadas. EET-Pichilingue-INIAP, provincia de Los Ríos, Ecuador

$$NG = \frac{N_{out}/N_{total}}{G_{out}/G_{total}} = \frac{rN}{rG} \quad (3)$$

Donde:

N_{out} = Número de árboles excluidos del rodal

N_{total} = Número total de árboles del rodal

G_{out} = Área basimétrica extraída del rodal

G_{total} = Área basimétrica total del rodal

Un principio importante para la descripción de los cambios de ubicación y forma de las clases diamétricas consiste en modelar la distribución teórica de los parámetros antes y después del raleo [13]. La distribución Weibull se ha popularizado para modelar el crecimiento y rendimiento de las plantaciones, esto se debe a su sencillez y nivel de precisión [14]. La función tri-paramétrica es la siguiente:

$$f(x) = \frac{c}{b} \left[\frac{x-a}{b} \right]^{c-1} e^{-\left(\frac{x-a}{b}\right)^c} \quad (4)$$

Donde x representa a la variable aleatoria (diámetros de los árboles). Los parámetros de la distribución son los siguientes:

a = Parámetro de ubicación, el cual relaciona el rango de distribución

b = Parámetro de escala, el cual determina la densidad del rodal

c = Parámetro de forma, el cual establece la asimetría de la distribución

Resultados

Evaluación de calidad

Variables que presenten comunalidades mayores a 0,70 pueden ser vistas como aceptables para la interpretación del análisis de componentes principales [10]. De las 30 variables propuestas en la metodología, han sido eliminadas el 46%. En la Tabla 2, se presenta las variables seleccionadas por sus valores son mayores a 0,70. La intensidad básica de conducir un análisis de componentes

VARIABLES	Valores de las Comunalidades
Calidad 2	0,71
Calidad 3	0,73
Autopoda 1	0,80
Autopoda 2	0,75
Sanidad Alta	0,96
Sanidad Media	0,96
Rectitud 1	0,76
Rectitud 2	0,99
Rectitud 3	0,77
Bifurcación 1	0,83
Bifurcación 2	0,71
Dominancia C	0,96
Dominancia D	0,72
Dominancia I	0,81
Dominancia S	0,89
Altura Comercial	0,79

Tabla 2: Valores de comunalidades de las variables seleccionadas

principales es de reducir y crear un nuevo set de variables no correlacionadas unas con otras y que explique la variación entre observaciones.

En la Figura 2, se resume la estructura de los 6 componentes principales extraídos, los cuales explican el 82,62 % del total de la varianza. Con las 16 variables seleccionadas, se generó la matriz de distancias para el análisis de conglomerados.

La prueba de pseudo t^2 sugirió conformar tres conglomerados (Tabla 3). El primero agrupó a 1995 árboles (77,63 %), el segundo a 317 árboles (12,33 %) y el tercero a 258 árboles (10,04 %).

La prueba multivariada de Wilk's Lambda, mostró diferencias altamente significativas entre los conglomerados ($P = 0,0001$). El análisis discriminante basado en la matriz de covarianza combinada de las 16 variables, reveló diferencias bien marcadas entre conglomerados (Tabla 4).

Del análisis discriminante se obtuvieron dos variables canónicas, la (1) tuvo peso fuerte de características que permiten identificar problemas claros de manejo de las plantaciones y de mala calidad de semilla utilizada, con una carga negativa para autopoda 1 y rectitud 3, indicando relaciones inversas con éstas. La (2) mostró mayor influencia de aspectos relacionados con la sanidad, calidad y rectitud 1, 2; variables que revelan relaciones inversas (Figura 3).

Conglomerado 1 está formado por un numeroso grupo de árboles de calidad buena y aceptable, mayor ramificación, alta presencia de grano y gambas, de sanidad alta, menor presencia de torceduras, cantidad de bifurca-

Conglomerados	1	2	3
1	0		
2	225,34	0	
3	101,56	75,56	0

Tabla 3: Matriz de distancias generalizadas al cuadrado $D^2(i|j)$ entre pares de conglomerados

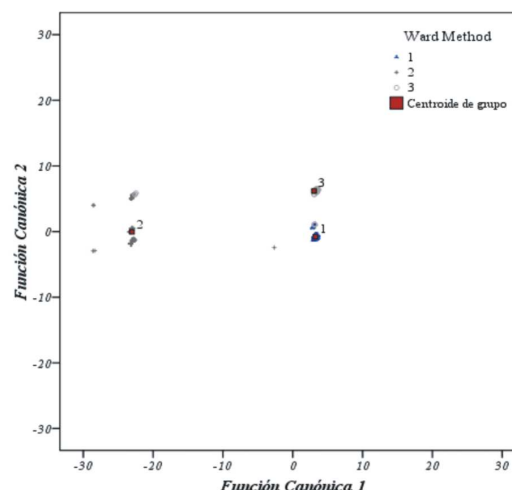


Figura 3: Relación entre los conglomerados o grupos de árboles con respecto a las variables canónicas 1 y 2, EET-Pichlingue-INIAP, provincia de Los Ríos, Ecuador

ciones altas, se encuentran en los 3 estratos del bosque (D, C, I), con diámetros promedio de 0,33m y altura comercial promedio de 8,89 m (Tabla 5). Conglomerado 2 se caracterizó por la presencia de árboles sin valor comercial maderable, sanidad baja, presencia de torceduras severas, fustes bifurcados a baja altura que son indeseables para la producción de madera, pertenece al estrato suprimido, diámetro promedio de 0,22 m y una altura comercial promedio 3,29 m. Conglomerado 3 agrupa a árboles que permiten aprovechar al menos el 50 % del fuste en producto de aserrío, sanidad media, con torceduras o alabeos leves, ausencia de ramas en las 3

Variable canónica	CAN1	CAN2
Correlación canónica	0,99***	0,90***
Valor propio	74,78	4,33
Explicación de la variabilidad (%)	94,51	5,48

Variables		
Altura Comercial S	0,86	
Autopoda 1 S	-0,70	
Dominancia D S	0,66	
Dominancia C S	0,57	
Bifurcación 2 S	0,54	
Autopoda 2 M	0,49	
Dominancia I	0,48	
Bifurcación 1 S	0,47	
Rectitud 3 S	-0,40	
Dominancia S	0,20	
Sanidad Media		0,96
Sanidad Alta		-0,87
Calidad 3		0,85
Calidad 2		-0,50
Rectitud 1		-0,45
Rectitud 2		0,40

Tabla 4: Variables de mayor peso en la estructura canónica total y su relación con la clasificación de árboles de teca en la EETP-INIAP, provincial de Quevedo, Ecuador.

*** estadísticamente diferentes de cero ($P < 0,001$) * ($P < 0,05$)

primeras trozas, con inclinación, este conglomerado de árboles se presenta en los tres estratos del bosque (D, C, I). El diámetro promedio es de 0,33m, y la altura comercial promedio es de 8,78 m.

Descripción del raleo

Estructura forestal de los rodales

Dos de las variables de dimensión más relevantes para la práctica forestal son el diámetro a la altura de pecho y la altura. La frecuencia relativa de una clase diamétrica se puede interpretar como la probabilidad de que un árbol de un rodal con una distribución diamétrica determinada pertenezca a dicha clase diamétrica. En la Figura 4 se muestra el histograma de frecuencias de la distribución de diámetros. Sobre la distribución de frecuencias empírica discreta se ha representado una curva continua tanto para los rodales antes (línea celeste) y después del raleo (línea roja) (Figura 4). El área bajo la curva entre dos valores de diámetro corresponde con la probabilidad de que un árbol cualquiera del rodal tenga un diámetro comprendido entre esos dos valores. A este tipo de funciones continuas se las denomina funciones de densidad. Así, en barras grises se muestra la estructura actual de los rodales (Figura, 4), mientras que la distribución diamétrica de los árboles remanentes (las barras color negro) se representa en la Figura 4.

A través de la línea continua se modela la distribución estimada y la zona achurada representa el área estimada de raleo. Por otro lado, el parámetro de ubicación a , simboliza al diámetro mínimo observado, este parámetro se incrementaría por acción de la eliminación de clases diamétricas pequeñas. El parámetro de escala b , se ampliaría como efecto de la disminución de la densidad de los rodales como consecuencia del raleo, mientras el parámetro de forma c , indica un claro desplazamiento hacia la derecha, como consecuencia de dejar en pie árboles de clases diamétricas grandes (Tabla 6).

Intensidad del raleo

La caracterización de la intensidad del raleo es resumida en la Tabla 7. Se resalta la alta densidad de los rodales, los cuales mediante el raleo se reducirían a un

promedio de 72 árboles por hectárea. Las alturas máximas fluctúan entre 27,51 y 22,60m, mientras que el área basimétrica promedio de 40,34 m² se reduciría a 7,25 m². El espaciamiento relativo promedio es de 19,21 %, el cual aumentaría a 47,80 %. El volumen inicial promedio es de 225,21 m³ha⁻¹ y serían extraídos un total de 171,26 m³ha⁻¹, quedando un volumen final de 53,95 m³ha⁻¹. Los valores de NG son mayores a uno (Tabla 7).

Discusión

Método de evaluación de plantaciones de Teca

Los datos obtenidos en la presente investigación, aplicando la metodología empleada para calidad de las plantaciones, propuesta por Rosas y Murillo [15] y posteriormente por Murillo y Badilla [9] para un total de 2570 árboles de teca, demuestran que el 46 % de las variables no son relevantes y útiles para la caracterización fenotípica de los mismos, lo cual tiene directa incidencia en costos y eficacia del método. De las 16 variables seleccionadas, la primera Función Canónica Discriminante que permite separar a los árboles de teca abarca a 10 variables, que explican el 94,51 % de la varianza. El 50 % de estas variables están relacionadas con la altura (manejo de la plantación). Kermodé [16] y Ryan [17] mantienen que, los árboles de teca presentan más aletones en bosque deciduos de poca humedad, los árboles de teca plantados en pendientes tienen principalmente los troncos cilíndricos, de igual manera árboles que han crecido sobre una topografía plana, poseen fustes que presentan aletones. De acuerdo a Aung [18], los aletones del fuste parecen ser causados por las raíces que crecen sobre suelos poco profundos que presentan una capa impermeable o agua freática muy alta. Esas raíces laterales llevan agua y minerales que fomentan un crecimiento mayor sobre todo el fuste y si son distribuidos desigualmente esto causará aletones. Justamente estos aspectos están siendo estudiados en la actualidad para determinar la influencia de las calidades de sitio sobre las características fenotípicas específicas de la teca [19, 20]. Estas dos investigaciones se basan en la metodología propuesta por Keiding et al., [21] y Kjaer et al., [22] para caracterizar fonológica de la teca mediante los siguientes parámetros: medición de altura total, comercial y diámetro a la altura del pecho. El radio de la corona es comúnmente medida como parámetro de competencia [23]. El radio corona/diámetro es un importante parámetro para deducir el límite de producción de área basal por sitio determinado de una especie. Alder y Synnott [24] describen la posición, clasificación de la corona (Tabla 8).

Espesor de la corteza: Es un parámetro que varía con las especies, edad, genotipo, grado de crecimiento y posición del árbol. Philip [25] encontró que, el espesor de la corteza depende de la naturaleza del cambium y el método de exfoliación. La exfoliación tiende a ser retardada, en árboles de lento crecimiento y las capas pueden ser acumuladas. En contraste, árboles de crecimiento rápido, lanzan la corteza más fácilmente y acumulan

Rodal	Estado del Rodal	Parámetros de la Función Weibull		
		a	b	c
1	Antes del Raleo	15	26,40	3,94
	Después del Raleo	20	26,70	6,00
2	Antes del Raleo	14	28,60	3,20
	Después del Raleo	22	31,30	6,20
3	Antes del Raleo	15	28,40	3,30
	Después del Raleo	29	33,10	7,40
4	Antes del Raleo	14	30,00	3,50
	Después del Raleo	25	25,20	5,50

Tabla 6: Cambios de los parámetros de la función Weibull, antes y después del raleo de teca, EET-Pichilingue-INIAP, provincia de Los Ríos, Ecuador

	Conglomerado 1	Conglomerado 2	Conglomerado 3	Sig	Chi cuadr/P
Número	1991	317	258	***	259,23
Calidad 1	58	0	0	***	17,13
Calidad 2	559	0	11	***	178,00
Calidad 3	1359	189	245	***	95,42
Calidad 4	15	128	2	***	818,40
Autopoda 1	751	295	112	***	338,64
Autopoda 2	606	18	66	***	85,51
Autopoda 3	389	4	46	***	64,51
Autopoda 4	295	0	34	***	44,30
Gambas	478	122	46	***	38,64
Grano	1924	295	247	**	9,43
Sanidad alta	1983	236	0	***	19,82
Sanidad Media	0	65	255	***	20,65
Sanidad Baja	8	16	3	***	56,71
Ramas	188	2	32	***	31,97
Rectitud 1	350	41	37	n.s.	5,32
Rectitud 2	1216	172	164	**	6,46
Rectitud 3	425	99	57	***	15,30
Rectitud 4	0	5	0	***	35,54
Inclinación	1829	233	243	***	166,25
Bifurcación1	790	2	97	***	185,25
Bifurcación2	312	6	47	***	46,29
Bifurcación3	540	50	66	***	18,51
Bifurcación4	349	259	48	***	599,13
Dominancia C	792	0	39	***	192,59
Dominancia D	834	1	97	***	204,54
Dominancia I	365	0	59	***	75,56
Dominancia S	0	316	3	***	25,29
Diámetro	33,73	32,64	32,92	***	289,43
Altura	8,89	3,29	8,78	***	390,97

Tabla 5: Diferencias fenotípicas de teca entre conglomerados en la EETP-INIAP, provincial de Los Ríos, Ecuador.

Rodal	Estado del Rodal	Número de Árboles	Altura Promedio (m)	Altura Máxima (m)	Área Basimétrica (m ²)	Volumen Comercial (m ³)	NG
1	Antes	346	20,78	23,78	47,01	25,72	1,48
	Después	80	21,59		22,68	6,02	
2	Antes	693	24,65	27,01	42,21	59,55	1,32
	Después	77	25,90		13,80	7,65	
3	Antes	347	20,76	22,60	58,42	29,34	1,41
	Después	57	21,67		23,75	6,31	
4	Antes	511	22,26	26,52	43,59	46,78	1,38
	Después	75	23,78		16,68	9,02	

Tabla 7: Caracterización de los raleos de teca referido a la hectárea, EET-Pichilingue-INIAP, provincia de Los Ríos, Ecuador

menos. El espesor de corteza se puede medir a la Altura del Pecho de un árbol de teca.

Forma de fuste y persistencia del eje

Una curvatura es definida como la distancia entre dos arcos de un fuste (Figura 5, izquierda). Una curvatura es considerada seria, si parte del fuste se aleja de la línea recta (eje imaginario) longitudinal [21].

Persistencia

Es la altura en la cual un eje es interrumpido por la presencia de ramas y es una característica significativa en relación a la calidad del fuste. Según Kjaer et al.,

[22] una rama es considerada un tronco o eje, si este excediera a los otros por un cuarto en el espesor.

El punto de ramificación es ocasionalmente puesto en discusión, cuando una o dos ramas gruesas se han desarrollado en el fuste. Sin embargo, si una rama principal puede ser reconocida por su tamaño, esa rama va a ser clasificada como persistente.

Tamaño y manera de ramificación

La clasificación del tamaño de las ramas es una medida relativa del diámetro de las ramas en proporción con el diámetro del fuste al pie de la bifurcación y se divide en 5 clases.

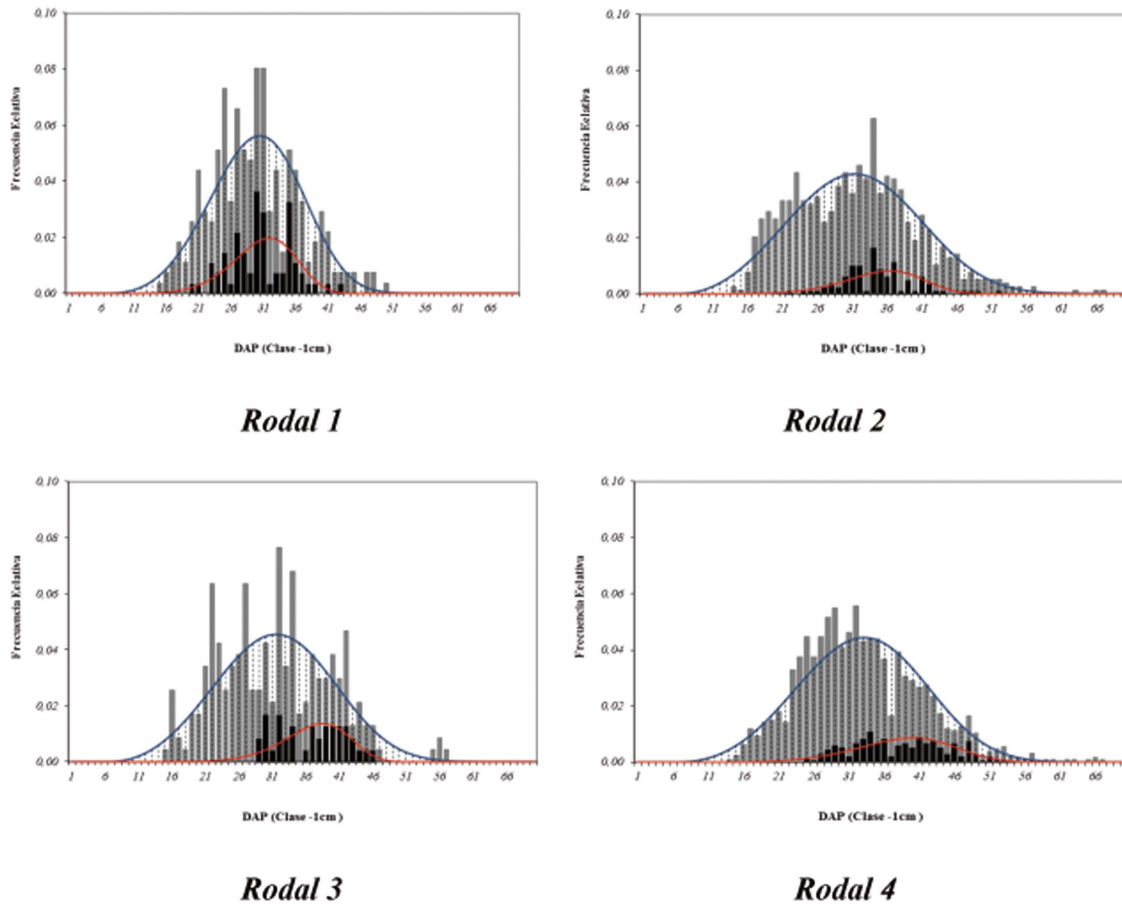


Figura 4: Distribución diamétrica antes y después del raleo de teca, EET-Pichilingue-INIAP, provincia de Los Ríos, Ecuador

Clase	Posición	Forma
1	Emergente	Perfecto
2	Luz completo sobre la corona	Bueno
3	Algo de luz sobre la corona	Tolerable, asimétrico o delgado
4	Algo de luz lateral	No satisfactorio, parte muerta y asimétrica
5	No recibe luz directa	Muy pobre, degeneración muerta

Tabla 8: Clasificación de la posición de la corona para plantaciones de teca

La manera de ramificación es graficada en la Figura 6.

Protuberancias o brotes

Este fenómeno esta cerradamente relacionado con la calidad del fuste y la ramificación del mismo. Este es descrito como una cicatriz antes del natural corte de ramas o epicornics. Kjaer et al., [22] los clasifica en la Tabla 11.

Aletones

Define como, la figura no circular de un tronco, que típicamente desarrolla por el crecimiento del lado superior de las raíces, mientras mantiene el apoyo de los árboles.

Clase	Posición	Forma
1	Recto	Completa
2	Poco inclinado, con pocas ramas pequeñas	Eje ramificado en la mitad del 4to cuarto
3	Inclinado con muchas ramas pequeñas	Eje ramificado entre el 3er y 4to cuarto
4	Torcido con una o dos ramas gruesas	Eje ramificado en la mitad 3er cuarto
5	Torcido con tres o más ramas gruesas	Eje ramificado entre el 2do y 3ro cuarto
6		Eje ramificado en la mitad del 2do cuarto
7		Eje ramificado entre 1ro y 2do cuarto
8		Eje ramificado en la mitad 1er cuarto
9		Doble o múltiple tronco a nivel del suelo

Tabla 9: Clasificación de la posición de ramas para plantaciones de teca.

Las subclases, número de protuberancias y la severidad de los aletones son propuestos por Kjaer et al., [22] y se muestra en la Figura 7.

Manejo de fuentes semilleras

Intensidad del raleo

En este estudio, el índice de tipo de raleo (NG) es relativamente uniforme y está distribuido en intervalos mayores a uno, entre 1,32 y 1,48. De acuerdo a Abetz [26] y Kramer [27], todos los rodales serían ligeramente raleados. Con esta intervención la EETP podría cumplir con las regulaciones de Ley, prevista en la Normativa de Semillas Forestales. De acuerdo a esta Normativa del MAE 2005, los rodales de la EETP pertenecerían al siguiente tipo de fuente semillera: "d. Fuente Semillera Seleccionada". Son rodales que no cumplen con uno o varios de los requisitos establecidos para rodales semilleros, principalmente porque no presentan un aislamiento adecuado, menos de 75 árboles aceptables por hectárea o porque aún no han sido sometidos a clareos de depuración. Las fuentes semilleras seleccionadas serán establecidas a partir de rodales naturales y plantaciones de cualquier tipo; deberán tener las siguientes características:

1. El rodal deberá ser superior a otros dentro de una misma área ecológica o región de procedencia.
2. La base genética deberá ser amplia, con al menos 200 individuos por hectárea para plantaciones.
3. Deberán haber por lo menos 50 árboles por hectárea con las características fenotípicas deseables según la especie.

Por otro lado, Bermejo, et al., [28] valida sus tablas de producción para plantaciones de teca en Costa Rica, mediante los siguientes tratamientos silviculturales:

1. Densidad de Plantación: 1111 árboles/ha (3m x 3 m).
2. Primer Raleo Sistemáticos a los 3 años de edad (altura máxima 8 m). La densidad del rodal sería de 750 árboles/ha aproximadamente.
3. El primer raleo comercial a los 5-6 años de edad (altura promedio = 15 m)

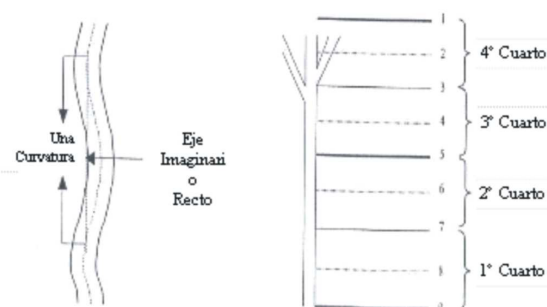


Figura 5: Ilustración de una curvatura (izquierda) y clases para determinar la persistencia del eje [21, 22]

Clase	Tamaño de la rama	
1	Muy Liviano	Menos de 1/4 de diámetro del fuste
2	Liviano	Alrededor de 1/4 de diámetro del fuste
3	Mediano	Entre 1/2 y 1/4 de diámetro del fuste
4	Pesado	Alrededor de 1/2 de diámetro del fuste
5	Muy Pesado	De 1/2 a 3/4 de diámetro del fuste

Tabla 10: Clasificación del tamaño y manera de ramificación de ramas en plantaciones de teca

4. Otros tres raleos con una rotación cada 5 años.
5. Aprovechamiento final a los 25 años de edad.

Altura máxima (H_o)

Las alturas máximas obtenidas en este estudio de 27,01; 26,52; 23,78 y 22,60 m, a la edad de 25 años, muestran que la EETP es un excelente lugar para el crecimiento de la teca. Estos resultados pueden ser comparados con los rendimientos observados en Costa Rica de 27,00; 24,30; y 21,70 m, a la edad de 25 años, con rodales bien manejados, bajo condiciones de temperatura media entre 26 y 29,8°C, precipitación media anual 1400 a 2450 mm, y a 300 metros sobre el nivel del mar [28-31]. Similares resultados fueron obtenidos en Costa Rica por Somarriba et al., [32] para la teca en plantaciones lineares en la Península de Nicoya. En el Ecuador, estos rendimientos pueden ser contrapuestos con las plantaciones realizadas con teca en las áreas de Bosque Seco Tropical y Bosque húmedo Pre-Montano del Bosque Protector Chongón-Colonche, donde en los mejores sitios pueden alcanzar 18 y 10 metros de altura en los peores sitios a la edad de 25 años [33].

Índice de espaciamento

El índice de espaciamento que hace relación a la altura máxima y el número de individuos de un rodal por hectárea fue determinado en este estudio. La filosofía es mantener constante la densidad y la distancia espacial relativa entre árboles. Esta distancia espacial es expresada en porcentaje de la altura máxima, cuando la

Clase	Presencia de Protuberancias de Brotación
1	Fuste libre de brotes protuberantes
2	Alrededor del 25 % del fuste con brotes protuberantes
3	Alrededor del 50 % del fuste con brotes protuberantes
4	Alrededor del 75 % del fuste con brotes protuberantes

Tabla 11: Clasificación de la presencia de perturbaciones de brotación en plantación de teca

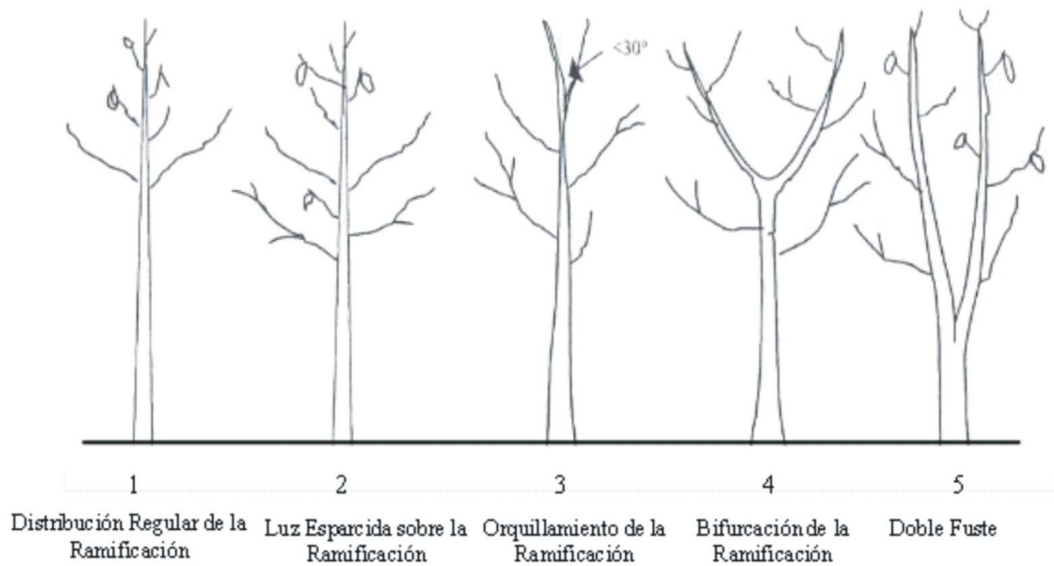


Figura 6: Determinando el tipo de ramificación (de acuerdo a [21])

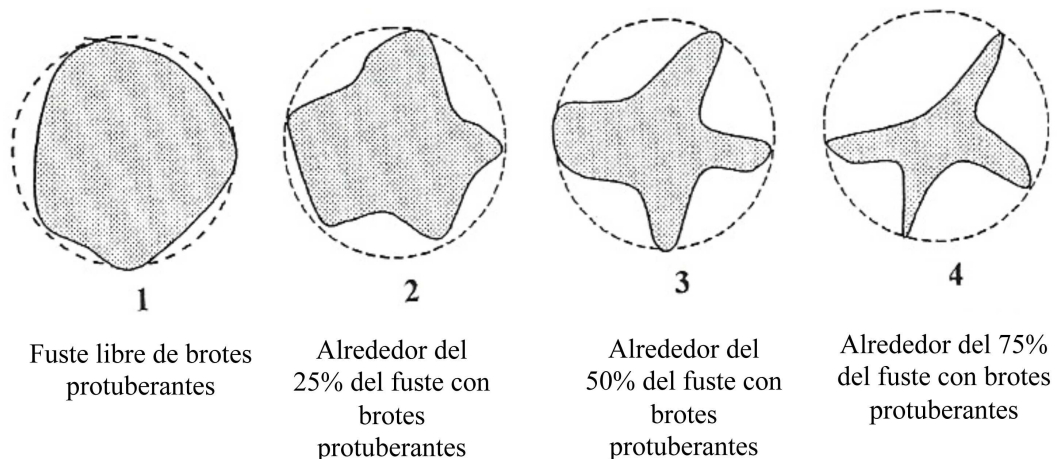


Figura 7: Clasificación para determinar el grado de aletones (de acuerdo a [22])

altura máxima se incrementa, la distancia espacial aumenta igualmente. En Costa Rica, de acuerdo a Bermejo, et al., [28], los índices de espaciamiento variaron entre 22 a 27 antes del raleo y de 27 a 34 después del raleo. Estos valores son apropiados para plantaciones con baja densidad. En los rodales no manejados de la EETP, estos valores se encuentran entre los 19,27 %, de ahí que poblaciones coetáneas desarrollan jerarquías de tamaños. Diferencias en el crecimiento de los árboles dan como resultado una estratificación del rodal forestal. Al contrario, contrastes en tamaño son usualmente intensificada a través de la estructura del rodal, la cual limita el acceso de los recursos a los individuos subordinados. La segregación en clases dominantes es importante para mantener el nivel de productividad del rodal. Desde el punto de vista forestal, esto significa que, siempre habrá unos pocos árboles (dominantes) que tienen la capacidad de extender sus coronas. Este proceso produce un rápido crecimiento en sitios de alta calidad. Igualmente una jerarquía de tamaño puede

desarrollar también la ausencia de competencia. Todos estos factores explican, porque los árboles se vuelven dominantes en un rodal coetáneo [34].

Volumen comercial

En este estudio se determinó el volumen comercial de los rodales de teca no manejados a la edad de 25 años. Ellos presentan una producción de entre 146 a 365 m³ ha⁻¹ con una densidad respectivamente de 347 árboles ha⁻¹ a 695 árboles ha⁻¹. Esto significa de entre 6,00 a 9,00 m³ ha⁻¹ por año. Estas cifras pueden ser comparadas con Bermejo, et al., [28] quien resalta que, se pueden obtener cosechas excelentes ingresos económicos de las plantaciones de la teca con tratamientos silviculturales convenientes basados en principios científicos y medio ambientalmente legítimos. Los resultados obtenidos en Guanacaste de 8,60 m³ha⁻¹ por año (volumen comercial) para rotaciones de 25 años, es bastante bueno y no necesitan ser manipulados para atraer inversión para los proyectos de reforestación en Costa Rica [28].

Función Weibull

Un manejo eficiente de plantaciones requiere más que simples estimaciones de volumen en pie o área basal. Frecuentemente es necesario conocer la distribución de tamaños de árboles que componen un determinado estrato de la plantación, ya sea para definir el tipo de tratamiento silvícola [35]. Esta investigación muestra que, la estimación de los cambios ocasionados por los raleos dentro de los rodales de teca es posible. El método aplicado modela la distribución del diámetro de árboles raleados y la posición restante del rodal remanente principalmente. La distribución inicial y final según el tipo de diámetro está debidamente modelada. De tal manera que, la distribución de la cantidad total árboles raleados también fue estimada [14, 36, 37]. La Estación Experimental Tropical Pichilingue es considerada como la fuente semillera de teca en el Ecuador. Lamentablemente, la categoría actual a la normativa propuesta por el MAE es de “d. Fuente Semillera Seleccionada”. Pero poco se hace para poder manejar material de alta calidad y que por falta de manejo, no cumple con las condiciones deseadas para la certificación de semilla. Adicionalmente, la falta de manejo de estos rodales, conduciría a problemas de endogamia que afecta caracteres cuantitativos, como tamaño, vigor, fertilidad y rendimiento de producción. En este estudio se determinó el volumen comercial de los rodales de teca no manejados a la edad de 25 años. Ellos presentan una producción de entre 146 a 365 m³ ha⁻¹ con una densidad respectivamente de 347 árboles ha⁻¹ a 695 árboles ha⁻¹. Esto significa de entre 6,00 a 9,00 m³ ha⁻¹ por año. Mostrando que, la EETP es un excelente lugar para el crecimiento de la teca. Lo cual, cumple con la normativa de que, el rodal deberá ser superior a otros dentro de una misma área ecológica o región de procedencia.

Referencias

- [1] Hoch, L.; Pokorny, B.; Medina, G. 2008. “Plantaciones forestales por productores familiares en la Amazonía”. *Proyecto For Live. EU/CIFOR*, : 6.
- [2] Evans, J.; Turnbull, J. 2004. “Plantation Forestry in the Tropics”. 3rd ed. Clarendon Press., : 403.
- [3] Evans, J. 1992. “Plantation forestry in the tropics”. second ed. Clarendon Press., : 200.
- [4] Keipi, K. 1999. “Introduction. Forest Resource Policy in Latin America”. In: Keipi, K. (Ed.), *Inter-American Development Bank. Johns Hopkins University Press, Washington, DC*, : 1–10.
- [5] FAO. 2000. “Global Forest Resources Assessment 2000: Main Report”. *Food and Agricultural Organization of the United Nations, National Forestry Action Plans and Forest Resources Assessment, FAO. Consultado 1-4-2013 en: www.fao.org/forestry/site/fra2000report/en*.
- [6] Pérez, D.; Kanninen, M. 2005. “Stand growth scenarios for *Tectonagrandis* plantations in Costa Rica”. *Forest Ecology and Management*, : 425–441.
- [7] Pérez, D. 2008. “Growth and volume equations developed from stem analysis for *Tectonagrandis* in Costa Rica”. *Journal of Tropical Forest Science*, 20(1):66–75.
- [8] Cañadas, L. 1983. “El mapa bioclimático y ecológico del Ecuador”. *Editores Asociados. Quito, Ecuador*, : 210.
- [9] Murillo, O.; Badilla, Y. 2004. “Calidad y valoración de plantaciones forestales”. *Cartago, Instituto Tecnológico de Costa Rica*, : 51.
- [10] Bortz, J. 2005. “Statistik für Sozialwissenschaftler”. 6 Auflage. Springer-Verlag, : 900.
- [11] Anderberg, M. 1973. “Cluster analysis for applications. Probability and mathematical statistics”. *Academic Press*, : 359.
- [12] Kassier, H. 1993. “Dynamics of diameter und height distribution in commercial timber plantations”. *Ph D dissertation, Faculty of Forestry. University of Stellenbosch, South Africa*, : 190.
- [13] Staupendahl, K. 2000. “Bestandesbezogene Modellierung von Durchforstungen in Buchenreinbeständen auf der Basis des Stammzahl-Grundflächen-Verhältnisses”. In: G. Kenk., (Hrsg.) *Deutscher Verband Forstlicher Forschungsanstalten, Sektion Ertragskunde Beiträge zur Jahrestagung in Volpreihausen, Sollin*, : 112–125.
- [14] Staupendahl, K.; Puumalainen, J. 1999. “Modellierung des Einflusses von Durchforstungen auf die Durchmesser- und Höhenverteilung von gleichaltrigen Fichtenreinbeständen”. *Centralblatt für das gesamte Forstwesen*, : 249–262.
- [15] Rojas, O.; Murillo, O. 2000. “Calidad de las plantaciones de Teca en la Península de Nicoya”. *Costa Rica. Agronomía Costarricense*, 24(2):65–76.
- [16] Kermode, C. 1964. “Some aspects of silviculture in Burma”. *Central Press Rangoon*, : 168.
- [17] Ryan, P. 1982. “The management of Burmese teak forest”. *Commonwealth Forestry Review*, 61(2):115–120.
- [18] Aung, S. 1952. “Regeneration of Teak in Burma”. *The Burmese Forester, Forest Department, Myanmar*, 2:23–35.
- [19] Mollick, A.; Sajjaduzzaman, M.; Golan, P.; Rana, R.; Tarique, K. 2005. “Stand quality assessment of Teak (*Tectonagrandis* Linn. F)”. *International Journal of Agriculture and Biology*, 7(4):543–546.
- [20] Kyaw, N. 2003. “Site Influence on Growth and Phenotype of Teak (*Tectonagrandis* Linn. f.) in Natural Forests of Myanmar”. *Ed. Cuvilier. Göttingen, Germany*, : 163.
- [21] Keiding, H.; Kemp, R.; Lauridsen, E. 1986. “Evaluation of International Series of Teak Provenance Trials”. *Danida Forest Seed Center, Humlebaek, Denmark*, : 81.
- [22] Kjaer, E.; Lauridsen, E.; Welledorf, H. 1995. “Second Evaluation of an International Series of Teak Provenance Trials”. *Danida Forest Seed Center Humlebaek, Denmark*, : 81.

- [23] Gadow, K. 2004. "Forsteinrichtung. Steuerung und Analyse der Waldentwicklung. Beilage zur Vorlesung.". *Fakultät für Forstwissenschaften und Waldökologie. Universität Göttingen.*, : 246.
- [24] Alder, D.; Synnott, T. 1992. "Permanent Sample Plot Techniques for Mixed Tropical Forest". *Tropical Forestry Papers N.30. Oxford Forestry Institute, Department of Plant Science, University of Oxford, Nuffield Press*, : 231.
- [25] Philip, M. 1994. "Measuring trees and forest". *CAB International, Wallingford. Oxon (second edition)*, : 231.
- [26] Abetz, K. 1975. "Eine Entscheidungshilfe für die Durchforstung von Fichtenbeständen". *AFZ*, 30:666–667.
- [27] Kramer, H. 1988. "Waldwachstumlehre". *Hamburg und Berlin, Pery, Deutschland*.
- [28] Bermejo, I.; Cañelas, I.; San Miguel, A. 2004. "Growth and yield models for Teak plantations in Costa Rica". *Forest Ecology and Management.*, 172:213–225.
- [29] Akindele, S. 1991. "Development of a site index for teak". *J. Trop. For. Serv.*, 4(2):162–169.
- [30] Keogh, R. 1979. "Does teak have a future?". *Unasylva*, 31(126):13–19.
- [31] Miller, A. 1969. "Provisional Yield Tables for Teak in Trinidad". *Trinidad and Tobago, Government Printery, Port of Spain*.
- [32] Somarriba, E.; Beer, J.; Morataya, R.; Valvo, G. 1999. "Linderos de *Tectonagrandis* L.F. en el Trópico húmedo de Costa Rica y Panamá". *Rev. For. Centroam.*, 28:15–21.
- [33] Cañadas, A.; Roca, A. 2011. "Can the reforestation projects stop the extraction of wood from the Protected Forest Chongón-Colonche?". *Tropentag, Bonn University, Development on the Margin, Tropentag, Bonn University, Development on the Margin*.
- [34] Oliver, C.; Larson, B. 1996. "Forest Stand Dynamics". *John Wiley, New York.*, : 330.
- [35] Torres, J.; Magaña, O. 2001. "Evaluación de Plantaciones Forestales". *Ed. Limusa. México*.
- [36] Álvarez González, J.; Schröder, J.; Rodríguez Solleiro, R.; Ruíz González, A. 2002. "Modeling the effect of thinning on the diameter distribution of even aged Marina time pine stands". *Forest Ecology and Management*, 18:113–126.
- [37] Nagel, J.; Biging, S. 1995. "Schätzung der Parameter der Weibullfunktion zur Generierung von Durchmesserverteilungen". *AFJZ*, 166:185–189.

Mobility extraction in ultra thin, body buried oxide and fully depleted silicon-on-insulator MOSFET

Luis Miguel Prócel^{1,2*}, Jorge Moreno¹, Felipe Crupi² and Lionel Trojman¹

¹Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias e Ingeniería - El Politécnico.
Calle Diego de Robles y Vía Interoceánica, Campus Cumbayá, Edif. Maxwell.
Casilla Postal 17-1200-841, Quito, Ecuador.

²Dipartimento di Ingegneria Informatica, Modellistica, Elettronica e Sistemistica,
Università della Calabria, Via P. Bucci, 41C I-87036 Arcavacata di Rende (CS), Italy.

*Autor principal/Corresponding author, e-mail: lprocel@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: Cesar Zambrano, Ph.D.

Recibido/Received: 06/05/2013. Aceptado/Accepted: 01/06/2013.

Publicado en línea/Published on Web: 28/06/2013. Impreso/Printed: 06/06/2013.

Abstract

In this paper, we extract the mobility of ultra-thin, body buried oxide and fully depleted silicon-on-insulator MOSFET, for different front and back-gate configurations. The mobility values are found by using the Capacitance - Gate Voltage and Current - Gate Voltage characteristics. In addition, the maximum electron mobility is calculated for both configurations: SiON/Si (front-gate) and SiO₂/Si (back-gate). Based on the mobility peak, it is determined that the electron transport can be improved by a factor of 1.6 for the front gate configuration. This improvement is explained by the back-channel activation. On the other hand, for the back-gate configuration the electron mobility is improved by a factor of 2.5. A second peak is observed in the electron mobility but cannot be appreciated, mainly because of the influence of an additional capacitance.

Keywords. UTBB-FD-MOSFET, silicon-on-insulator, mobility, front-gate configuration, back-gate configuration

Resumen

En el presente trabajo, se extrae la movilidad de dispositivos MOSFET de silicio en aislante, ultra delgados y agotados completamente, para las configuraciones de compuerta frontal y trasera. Los valores de movilidad fueron encontrados usando las características Capacitancia - Voltaje de Compuerta y Corriente de Drenaje - Voltaje de Compuerta. Adicionalmente, se calcula el máximo de movilidad de electrones para ambas configuraciones: SiON/Si (compuerta frontal) y SiO₂/Si (compuerta trasera). En base al pico de movilidad encontrado, se determina que el transporte de electrones puede ser mejorado por un factor 1.6 para la compuerta frontal. Esta mejora se explica por la activación de la compuerta trasera. Por otro lado, en la configuración de compuerta trasera la movilidad de electrones se mejora en un factor 2.5. Un segundo pico puede ser observado en la movilidad de electrones, sin poder ser apreciado con claridad y siendo originado por la presencia de una capacitancia adicional.

Palabras Clave. UTBB-FD-MOSFET, silicio en aislante, movilidad, configuración de compuerta frontal, configuración de compuerta trasera

Introduction

The silicon-on-insulator (SOI) technology presents interesting advantages with respect to the bulk silicon in terms of higher speed, lower power consumption, less parasitic effects and advanced scalability [1–4]. This technology has been explored for around 30 years and in the last 10 years, it has been implemented in commercial computer processors [5]. The SOI technology introduces some parameters that can be used for opti-

mization of performance and scaling like the back-gate voltage (V_{G2}) and substrate doping [2–4]. As well, it has been shown that the short channel effects are reduced in ultra-thin SOI MOSFETs [2–4].

In fully depleted (FD) SOI MOSFETs, the back-gate voltage plays an important role in the control of the threshold voltage (V_{TH}) and in the behavior of the drain current (I_D). The strong interface coupling enables to enhance the drain current. The electron mobility is also

ISSN 1390-5384



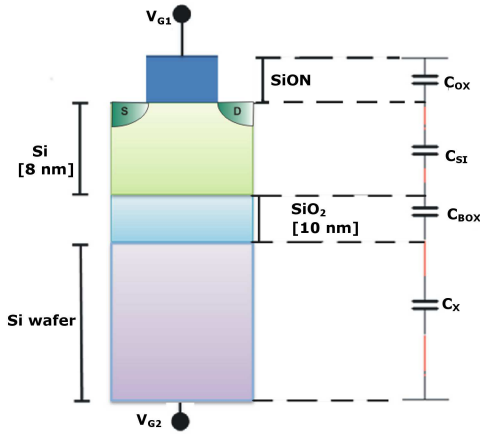


Figure 1: Transversal structure of the used UTFD-SOI-MOSFETs devices (right) and capacitance model (left). In this model, the parasitic capacitance, C_X , is originated by applying a voltage on the back-surface of the wafer.

affected by the back-gate voltage [1–4]. In the present work, we extract the mobility of ultra-thin, body buried oxide and fully depleted SOI MOSFETs (UTBB-FD-SOI-MOSFET) and we study the effects of the back-gate voltage in the electron transport. We also study the electron transport for two configurations: front-gate (or SiON/Si interface) and back-gate (SiO₂/Si interface).

Experimental Description

The UTBB-FD-SOI-MOSFETs devices used during this work have a 10x10 μm area. The front gate dielectric consists of 2.5nm SiON thickness, the body of 8nm of Si with doping of about 10¹⁵ cm⁻³ and the buried oxide consist of 10 nm of SiO₂ (Figure 1). The Front gate electrode is made of 5nm of TiN with poly-Si cap. The mobility extraction is carried out using the I-V and C-V characteristic method. For the C-V characteristic the Split C-V method was applied [6, 7]. First of all, the mobility of the front gate was extracted for different back-gate biases (V_{G2}), in a range between 0V-5V (step of 0.5V). Then, the back-gate mobility was extracted for various front gate biases (V_{G1}) in a range of 0V-1V (step of 0.1V). Once the source-to-drain current (I_{DS}) and the inversion capacitance C_{inv} were extracted, we assess the mobility by mean of the next expression [8]:

$$\mu_{eff} = \frac{L}{V_{DS} \cdot Q_{inv} \cdot W} I_D \quad (1)$$

Where $L[\mu\text{m}]$ is the length and $W[\mu\text{m}]$ is the width of the device, $V_{DS}[\text{V}]$ is the drain to source voltage, $Q_{inv}[\text{C}/\text{cm}^2]$ is the inversion charge and $I_D[\text{A}]$ is the drain current.

The effective electric field (E_{eff}) in SOI devices can be found using the next expression for the front-gate.

$$E_{eff}^{FG} = \frac{1}{2} Q_{inv}^{FG} \left(1 + \frac{C_P}{C_{FG}} Q_{inv}^{BG} \right) \quad (2)$$

Where E_{eff}^{FG} is the effective electric field for the front-gate, Q_{inv}^{FG} is the inversion charge in the front-gate, Q_{inv}^{BG} is the inversion charge in the back-gate, $C_{FG}[\text{F}/\text{cm}^2]$ is the front-gate capacitance and C_P is C_{FG}/C_{BG} (back-gate capacitance). Equation (2) is also used for computing the effective field in the back-gate, just changing the corresponding front-gate parameters and the back-gate parameters.

It is important to mention that the back-gate contact does not use a metallic electrode as the front gate but the p-type well of the Si substrate (below the barrier oxide, Figure 1). This produces extra gate capacitance capacitances that must be considered in the expressions as it will be discussed in great detail in the next section.

Experimental Results

Front-Gate Configuration (SiON/Si interface)

For all measurements done in this configuration, the voltage V_{G2} was varied in a range of 0-5V with 0.5V in every step. Figure 2 shows the C-V characteristic for the SiON/Si interface for different V_{G2} . We can see that there are two rising regions in the curve: the first one is due to the effect of C_{Si} and C_{OX} (Figure 1) and the second one is the value of C_{OX} alone. We have found that $C'_{OX} = 1.6 \times 10^{-7} \text{ F}/\text{cm}^2$. Figure 3 shows the Q_{inv} vs. V_{G1} that is the integral of the C-V characteristic. The $I_D - V_{G1}$ characteristic is shown in Figure 4. Figures 5 and 6 show the μ_{eff} vs. Q_{inv} and μ_{eff} vs. E_{eff} , respectively.

The mobility peak is extracted and plotted in function of V_{G2} in Figure 7. We can see that the maximum peak of mobility occurs at $V_{G2}=3\text{V}$ with $\mu_{eff}=480 \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$. This means that the back-gate contribution is able to increase the electron mobility in around 60%. The increase of the mobility peak can be explained by the activation of the back-channel which is consistent with [9]. Apparently, the back-channel is the only one activated, which will be confirmed in next configuration.

Back Gate-Configuration (SiO₂/Si interface)

Figure 8 shows the C-V characteristic for the back-gate configuration. Similarly, the first rising is due to the effect of C_{Si} and C_{BOX} (model in Figure 1). According to the device dimensions and the second rising of the C-V curve in Figure 8, we have: $C_{Si}=1.3 \times 10^{-6} \text{ F}/\text{cm}^2$ and $C_{BOX}=3.3 \times 10^{-7} \text{ F}/\text{cm}^2$. The value of the first rising is around $C'=1.3 \times 10^{-7} \text{ F}/\text{cm}^2$, which cannot be explained by considering only C_{Si} and C_{BOX} . At this point, we have the presence of an additional capacitance: C_X (Figure 1). By using the model presented in Figure 1, we obtain that $C_X=2.6 \times 10^{-7} \text{ F}/\text{cm}^2$ and that the silicon substrate located below the SiO₂ dielectric (of about 10nm) has a thickness of 40 nm. Figures 9 and 10 show the curves: Q_{inv} vs. V_{G2} and I_D vs. V_{G2} , which are used for the mobility extraction. The transconductance parameter (G_M) is plotted in Figure

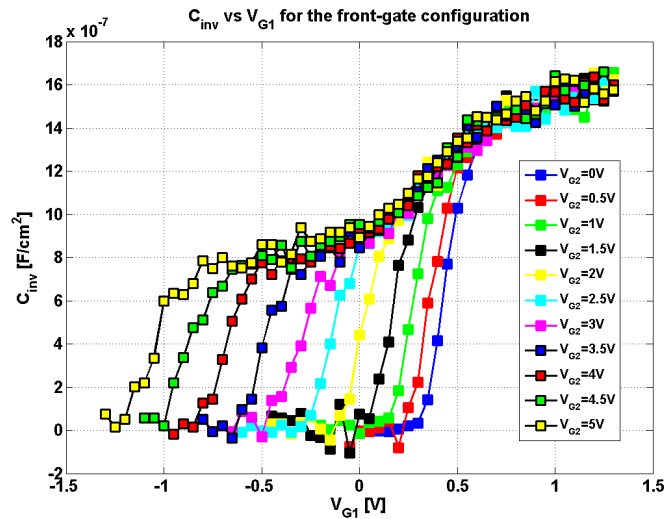


Figure 2: Inversion capacitance (C_{inv}) vs. Front gate voltage (V_{G1}) for the front gate configuration. These parameters are directly extracted from the devices.

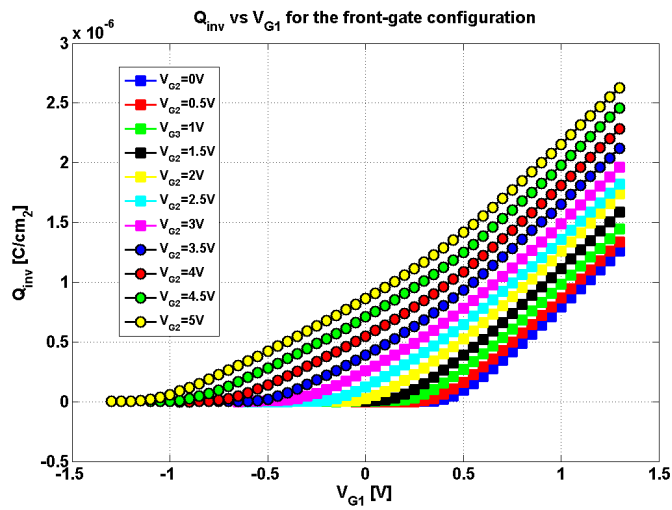


Figure 3: Inversion charge (Q_{inv}) vs. Front gate voltage (V_{G1}) for the front gate configuration. These curves are the result of the numerical integration of C_{inv} .

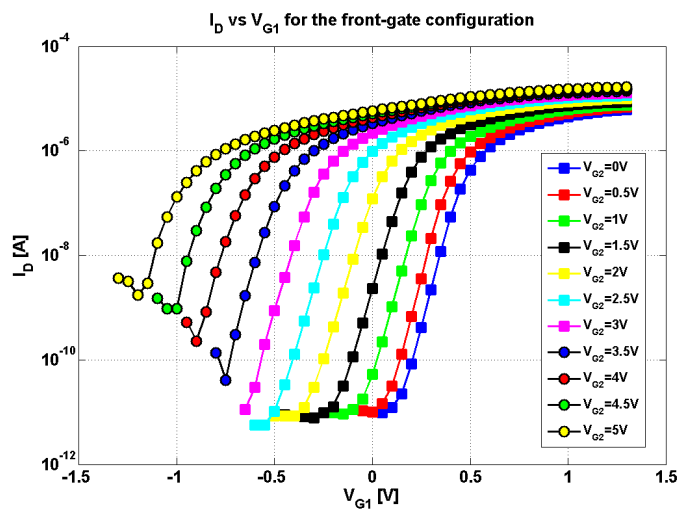


Figure 4: Drain current (I_D) vs. Front gate voltage (V_{G1}) for the front gate configuration. These parameters are directly extracted from the devices.

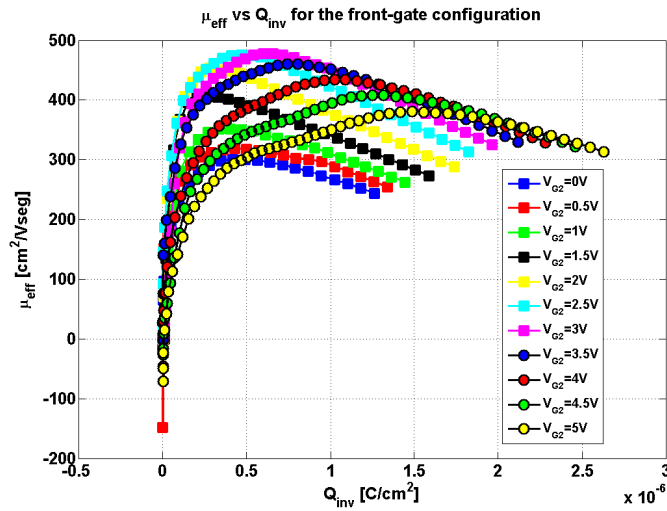


Figure 5: Mobility (μ_{eff}) vs Inversion charge (Q_{inv}) for the front gate configuration. Equation (1) is used for the mobility computation.

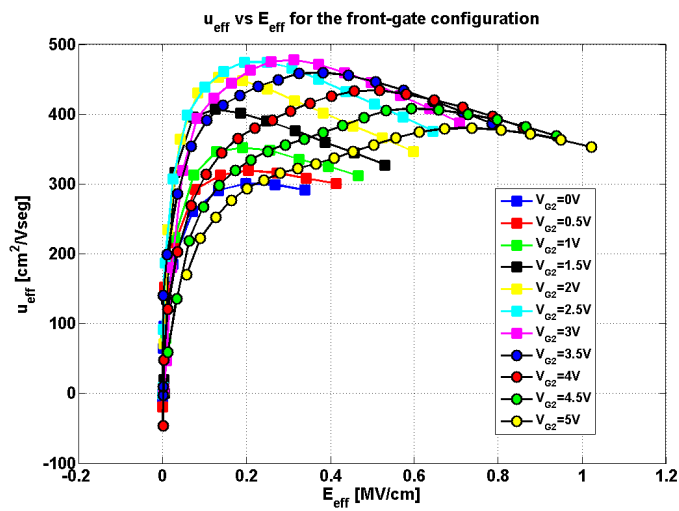


Figure 6: Mobility (μ_{eff}) vs Effective electric field (E_{eff}) for the front gate configuration. Equation (2) is used for the electric field computation.

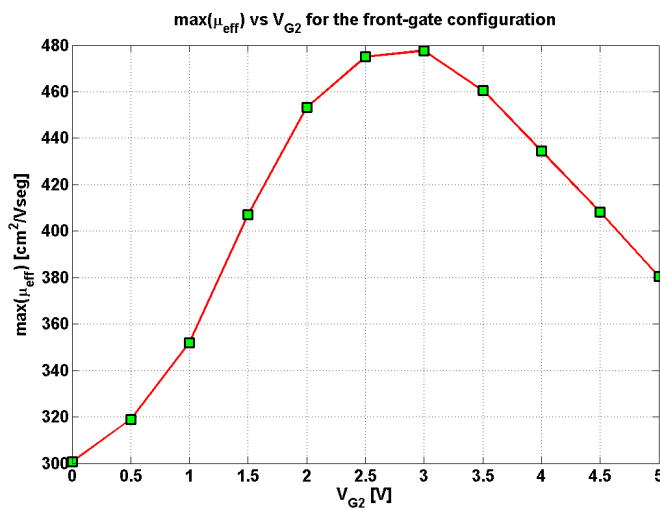


Figure 7: Mobility Peak ($\max(\mu_{eff})$) vs. Back gate voltage (V_{G2}) for the front gate configuration. Maximum electron transport occurs at $V_{G2}=3V$.

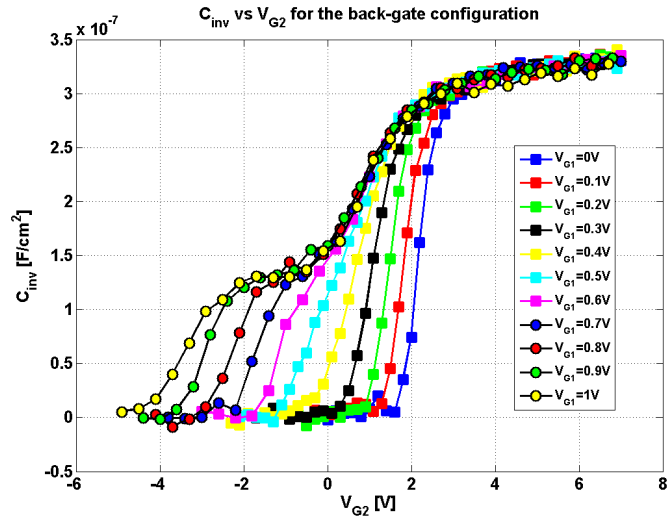


Figure 8: Inversion capacitance (C_{inv}) vs. back-gate voltage (V_{G2}) for the back-gate configuration. These parameters are directly extracted from the devices.

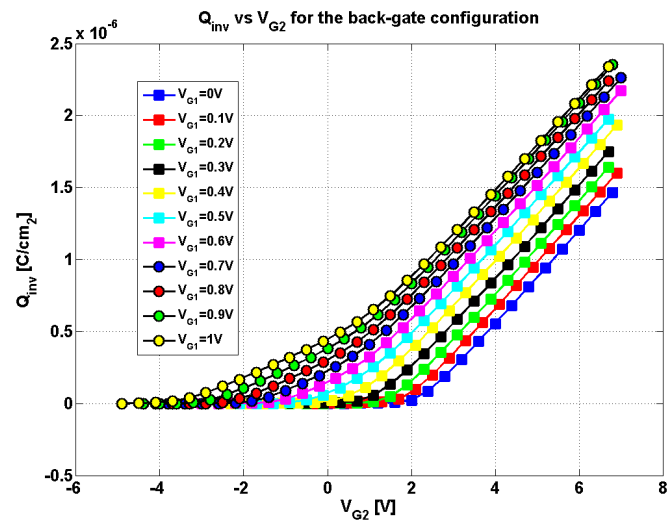


Figure 9: Inversion charge (Q_{inv}) vs. back-gate voltage (V_{G2}) for the back-gate configuration. These curves are the result of the numerical integration of C_{inv} .

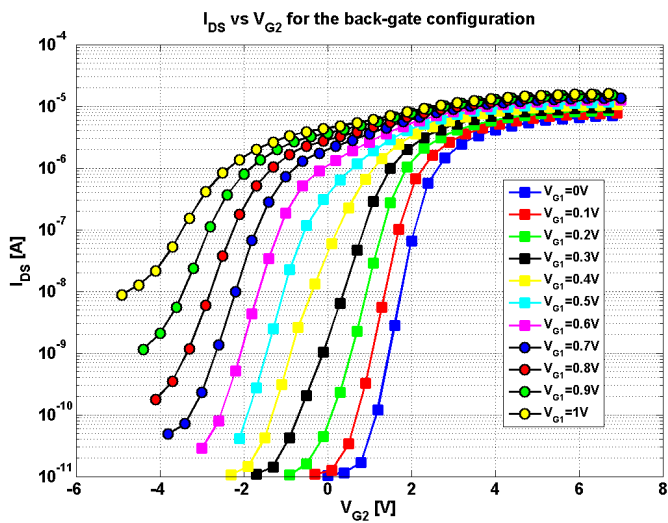


Figure 10: Drain current (I_D) vs. back-gate voltage (V_{G2}) for the back-gate configuration for the back-gate configuration.

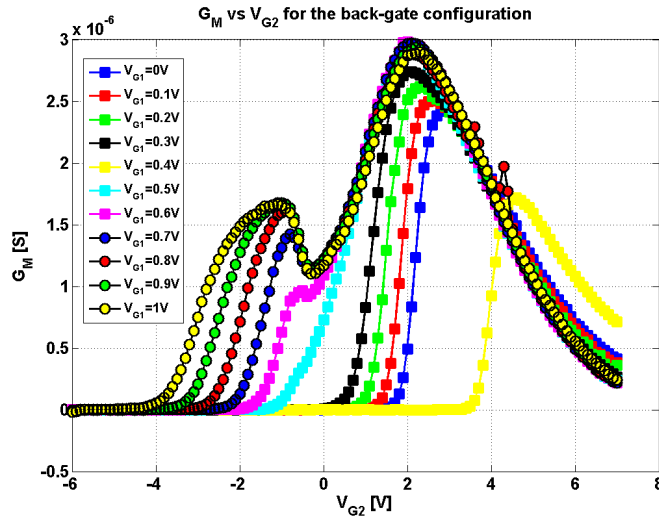


Figure 11: Trans-conductance (G_M) vs. back-gate voltage (V_{G2}) for the back-gate configuration for the back-gate configuration. Two peaks are evident for voltajes $V_{G1} > 0.5V$.

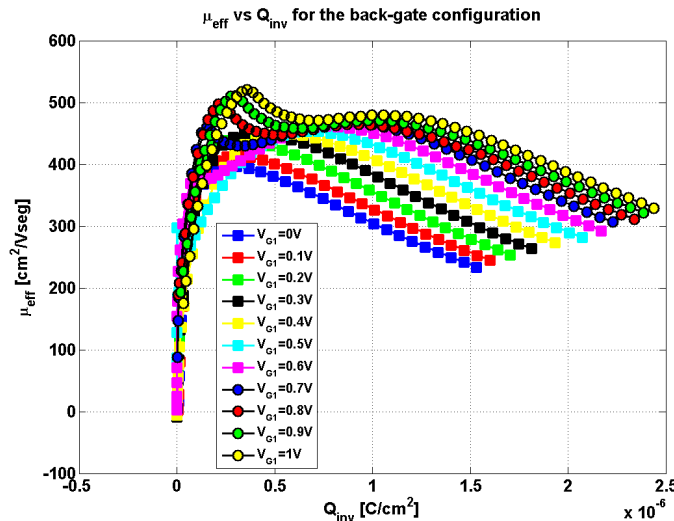


Figure 12: Mobility (μ_{eff}) vs Inversion charge (Q_{inv}) for the back-gate configuration. Equation (1) is used for the mobility computation. A second peak can be observed for $V_{G1} > 0.5V$.

11. We can see that there are two local maxima for the curves $V_{G1} \geq 0.6V$. The first peak is caused by the activation of the front gate and is lower than the second one.

Figures 12 and 13 show the curves μ_{eff} vs. Q_{inv} and μ_{eff} vs. E_{eff} for different V_{G1} . For curves $V_{G1} \geq 0.6V$, we can see that there are two local maxima of mobility, as we obtained for G_M . In this case, the first peak is higher than the second one which is consistent with the low capacitive value of C_X . The nature of this peak is not clear and a further study is needed to determine its role. However, it occurs only for negative back-gate bias, corresponding to strongly decreasing front-gate mobility; which is our main interest in this work.

The peak of mobility vs. V_{G1} is shown in Figure 14. If we eliminate the first peak of mobility for curves $V_{G1} \geq 0.6V$, we can see that the mobility stabilizes at $V_{G1} = 0.4V$ with $\mu_{eff} = 450 \text{ cm}^2/V.s$. Again, the increase of the mo-

bility peak with respect to V_{G1} is because of the activation of the front-channel. The contribution of the front-channel is able to increase the back-gate mobility in around 150%. The maximum values of mobility obtained in both configurations are very similar (6.66% of discrepancy) which confirms that the back-channel is the only one activated in the front-gate configuration consistent with [9].

Conclusions

The mobility parameter was extracted successfully in UTBB-FD-SOI-MOSFETs devices for the front and back-gate configurations. The maximum values of electron transport were obtained for $V_{G2} = 3V$ for the front gate configuration. A 60% of mobility increase can be obtained by the contribution of the back-gate, which increases the device performance considerably. In the case of the back-gate configuration, the tendency of the re-

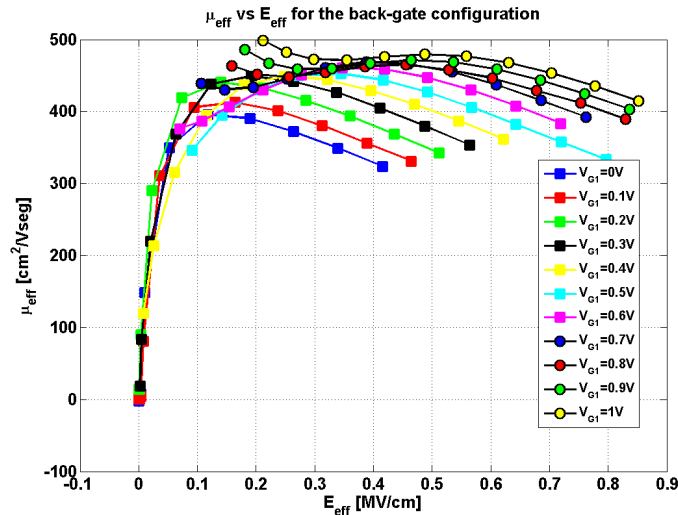


Figure 13: Mobility (μ_{eff}) vs Effective electric field (E_{eff}) for the back-gate configuration. Equation (2) is used for the electric field computation, with the respective changes.

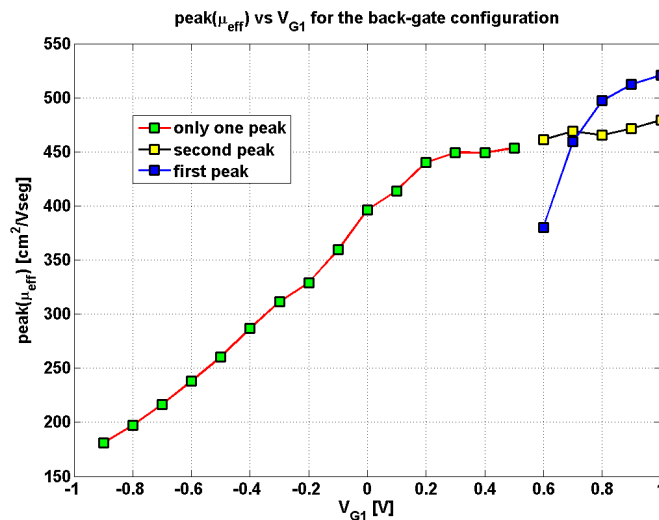


Figure 14: Mobility Peak ($\max(\mu_{eff})$) vs. front-gate voltage (V_{G1}) for the back-gate configuration. From $V_{G1}=0.6V$ two mobility peaks can be observed. The first peak rises faster than the second, this is related with the first trans-conductance peak.

sults was different: two peaks were obtained for the curves of trans-conductance and mobility. The appearance of the first peaks, in both curves, is related with the activation of the front gate.

The presence of an additional capacitive component, C_x , causes a large increment of the first mobility peaks for the curves $V_{G1} \geq 0.6V$, but this peak is related to the negative V_{G2} bias, where the front-gate mobility is getting decreased. Note that the maximum values of mobility stabilize at $V_{G1}=0.4V$. In the back-gate configuration, the contribution of the front-gate bias is able to increase the back-gate mobility in 150%. These experiments confirm that back-channel is the only one activated when the front channel reach its maximum. However, for larger V_{G2} , the mobility decreases in the front-gate configuration. In further experiments, it is planned to study the transport for *high-k* devices and understand what is happening for large V_{G2} .

Acknowledgments

The authors would like to thank Imec (Belgium) for providing the studied UTBB-FD-SOI-MOSFETs samples.

References

- [1] Cristoloveanu, S. 2001. "Silicon on insulator technologies and devices: from present to future". *Solid-State Electronics*, 83:1403.
- [2] Cristoloveanu, S.; Ghibaudo, G.; Ouisse, T.; Horiguchi, S.; Ono, Y.; Takahashi, Y.; Murase, K. 2003. "Ultimately Thin Double-Gate SOI MOSFETs". *IEEE Transactions on Electron Devices*, 50:830.
- [3] Ernst, T.; Tinella, C.; Raynaud, C.; Cristoloveanu, S. 2002. "Fringing fields in sub- $0.1\mu m$ FD SOI MOSFETs: Optimization of the device architecture". *Solid State Electron.*, 46:373.

- [4] Naveh, Y.; Likharev, K. 2000. "Modeling of 10-nm-scale ballistic MOSFETs". *IEEE Electron Device Letter*, 21: 242.
- [5] AMD. 2013. "AMD FX Processor Model Number and Feature Comparison". <http://www.amd.com/us/products/desktop/processors/amd/fx/Pages/amd-fx-model-number-comparison.aspx>. Access date: April 19th, 2013.
- [6] Ohata, A.; Cassé, M.; Cristoloveanu, S. 2007. "Front- and back-channel mobility in ultrathin SOI-MOSFETs by front-gate split CV method". *Solid State Electron.*, 51: 245.
- [7] Esseni, D.; Sangiorgi, E. 2004. "Low field electron mobility in ultra-thin SOI MOSFETs: experimental characterization and theoretical investigation". *Solid State Electron.*, 48:927.
- [8] Takagi, S.; Toriumi, A.; Iwase, M.; Tango, H. 1994. "On the Universality of Inversion Layer Mobility in Si MOSFETs: Part I-Effects of Substrate Impurity Concentration". *IEEE Transactions on Electron Devices*, 41:2357.
- [9] Ohata, A.; Bae, Y.; Fenouillet-Beranger, C.; Cristoloveanu, S. 2012. "Mobility Enhancement by Back-Gate Biasing in Ultrathin SOI MOSFETs With Thin BOX". *IEEE Electron Devices Letters*, 33:348.

Evaluación de diferentes niveles de povidextrosa y azúcar en la elaboración de una jalea de guanábana (*Annona muricata* L.)

María José Rosero¹, Stalin Santacruz^{1*}, Yamila Álvarez¹ y Mario Caviedes¹

¹Universidad San Francisco de Quito, Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador.

*Autor principal/Corresponding author, e-mail: stalin.santacruz@gmail.com

Editado por/Edited by: Cesar Zambrano, Ph.D.

Recibido/Received: 17/12/2012. Aceptado/Accepted: 27/04/2013.

Publicado en línea/Published on Web: 28/06/2013. Impreso/Printed: 06/06/2013.

Abstract

The task of the present research was to quantify the effect of polydextrose and sugar contents on the manufacture of guanabana jam. The sugar content was, 50, 55 and 60 g, whereas for polydextrose was 0, 0.30, 0.60 and 0.90 g. In each case the contents were based on 100 g of product. A completely randomized design with 3x4 factorial arrangement was used. The 12 treatments of the design were evaluated by using gel firmness, Brix and pH. Three treatments were chosen for the sensory analysis and the results showed that the best jelly was the one containing 60 % sugar and 0.90 % polydextrose.

Keywords. jam, polydextrose, *Annona muricata*

Resumen

El objetivo de esta investigación fue el de cuantificar la respuesta de diferentes niveles de povidextrosa y azúcar para la formulación adecuada de una jalea de guanábana; para lo cual, se evaluaron diferentes formulaciones con tres niveles de azúcar: 50, 55 y 60 g y cuatro niveles de povidextrosa: 0.0, 0.30, 0.60 y 0.90 g. En cada caso los niveles fueron basados en 100 g de producto. En la fase experimental se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo factorial de 3x4. Se evaluaron las respuestas de los 12 tratamientos de las variables penetrabilidad (dureza del gel), grados brix y potencial de hidrógeno (pH). Se seleccionaron tres para la evaluación sensorial. Los resultados permitieron demostrar que el prototipo más aceptado fue el que contenía 60 g de azúcar y 0.90 g de povidextrosa, constituyéndose en la formulación final.

Palabras Clave. guanábana, jalea, povidextrosa, *Annona muricata*

Introducción

Las annonas comprenden un grupo de más de 50 especies de arbustos y árboles pequeños de los cuales 8 a 10 producen frutos comestibles [1]. El sabor de la mayoría de las annonas es dulce, cremoso y agradable. La guanábana *Annona muricata* L. pertenece a la familia Anonácea a la que también pertenecen el anón, el mamón, y la chirimoya [2]. La guanábana es originaria de América tropical, es una fruta climatérica, muy susceptible al frío, y prospera bien en tierras húmedas tropicales por debajo de los 1000 metros sobre el nivel del mar. Su pulpa contiene carbohidratos y varios minerales como fósforo, hierro, sodio y vitaminas como A, B, C y niacina [2]. La fruta se utiliza para hacer bebidas refrescantes y dar sabor a pastas y helados, con la pulpa se puede hacer jaleas y conservas [3].

La povidextrosa se conoce con el nombre comercial de Litesse II o povidextrosa super mejorada FCC, es un

polímero condensado con uniones aleatorias de polímeros de D-glucosa con algunos enlaces de sorbitol y ácido cítrico; es altamente soluble en agua pero parcialmente soluble en solventes orgánicos [4]. La povidextrosa actúa como fibra soluble en el organismo humano y es resistente a la hidrólisis de las enzimas digestivas por lo tanto, provee de varios beneficios a la salud. [5].

La pectina es una agente gelificante natural presente en las frutas; actúa en la gelificación de mermeladas y jaleas. La molécula de pectina está esencialmente compuesta por largas cadenas de ácido poligalacturónico parcialmente metoxilado. Asimismo, la pectina aumenta su disponibilidad a medida que la fruta madura; la adición de azúcar tiene un efecto deshidratante sobre la pectina y reduce su solubilidad. El edulcorante más utilizado en la elaboración de jaleas es la sacarosa, o azúcar blanca [6].

La evaluación sensorial de alimentos o de otros produc-

ISSN 1390-5384



Variable	Fuente de variación	GL	CM	Fc
Penetrabilidad	Total	35	–	–
	Tratamiento	11	674.21	146.25*
	Azúcar (A)	2	85.75	18.60*
	Polidextrosa (B)	3	1874.26	405.56*
	Interacción AxB	6	270.34	58.64*
	Error experimental	24	4.61	
Grados Brix	Total	35	–	–
	Tratamiento	11	1.78	8.90*
	Azúcar (A)	2	2.67	13.35*
	Polidextrosa (B)	3	0.12	0.60 NS
	Interacción AxB	6	2.32	11.60*
	Error experimental	24	0.20	
Potencial de Hidrógeno (pH)	Total	35	–	–
	Tratamiento	11	0.02154	37.72*
	Azúcar (A)	2	0.0070	12.26*
	Polidextrosa (B)	3	0.0440	77.05*
	Interacción AxB	6	0.01516	26.54*
	Error experimental	24	0.00057	
* Significativo $p < 0.05$		NS No significativo $p < 0.05$		

Tabla 1: Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de las variables penetrabilidad (dureza del gel), grados brix y potencial de hidrógeno (pH) de los doce tratamientos

tos puede ser usada para realizar un análisis preliminar del sabor del alimento y proveer indicios para luego realizar análisis físico químicos. Asimismo, cambios en las características sensoriales pueden proveer información sobre cambios en las características físicas de un alimento [7].

El objetivo del presente estudio fue el de cuantificar la respuesta de diferentes niveles de polidextrosa y azúcar para la formulación adecuada de una jalea de guanábana.

Materiales y Métodos

Producto

Para la elaboración de la formulación de la jalea de guanábana se utilizarán diferentes proporciones de ingredientes por cada 100 g. La fórmula inicial contuvo zumo de guanábana, azúcar blanca, pectina de alta metoxilación, ácido cítrico y benzoato de sodio, obtenidos en el mercado local. La polidextrosa “Litesse” fue adquirida de Danisco.

Características del producto

Para la evaluación de las características de la formulación se realizó un experimento preliminar de penetrabilidad para determinar la dureza del gel [8]. La penetrabilidad del producto inicial fue de 210 (1/10 mm) que al compararla con la penetrabilidad de 193 (1/10 mm) de la jalea de mora “Snob”, permitió obtener una menor dureza del gel. El producto final fue desarrollada considerando diferentes porcentajes de polidextrosa y azúcar por cada 100 g de producto generando doce tratamientos que fueron la combinación de cuatro niveles de polidextrosa “Litesse” (0.00; 0.30; 0.60; 0.90 g) y tres niveles de azúcar (50.00; 55.00 y 60.00 g).

Fase experimental y análisis estadístico

Los 12 tratamientos fueron evaluados bajo un diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo factorial de 3x4. Se cuantificaron tres variables: penetrabilidad (dureza del gel), grados brix y pH; utilizando diferentes métodos y normas estandarizadas. Para dureza del gel el método del penetración [8], grados brix, norma INEN 380 [9] y pH norma INEN 389 [10].

Para la evaluación de los resultados se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con arreglo factorial para cada variable bajo estudio y una prueba de separación de medias de “Tukey” para determinar la significación estadística de las diferencias entre las medias y establecer sus rangos [11]. Para la selección de los mejores tratamientos considerando las tres variables, se utilizó valores de ponderación en relación con el nivel de importancia que se le asignó a cada variable en el siguiente orden: dureza del gel, grados brix y pH.

Evaluación sensorial

Para el análisis y estudio de aceptabilidad del producto, se aplicaron diferentes métodos estadísticos: análisis de varianza de dos vías [11], pruebas utilizando el modelo Thurstoniano (Norma ASTM E2262 – 03) e índice R [12, 13]. Asimismo, se utilizó la metodología de la AOAC 1990 para el análisis físico-químico del producto.

Resultados y discusión

Análisis de varianza

En la tabla 1 se presentan las ANOVAS para las variables penetrabilidad, grados brix y potencial hidrógeno;

N°	Tratamientos		Variables		
	Niveles		Penetrabilidad*	Grados Brix*	pH*
Azúcar (g)	Polidextrosa (g)				
12	60.00	0.90	187.0 a	65.37 cd	3.22 abc
4	50.00	0.90	186.7 a	65.53 cd	3.25 a
8	55.00	0.90	183.7 a	66.40 abc	3.25 a
11	60.00	0.60	177.3 b	65.27 cd	3.17 bc
6	55.00	0.30	175.3 b	65.37 cd	3.21 abc
2	50.00	0.30	164.3 c	65.20 cd	3.15 cd
10	60.00	0.30	157.0 d	66.67 abc	3.18 abc
9	60.00	0.00	155.7 d	67.27 a	3.16 bc
7	55.00	0.60	154.7 d	67.00 ab	3.13 d
3	50.00	0.60	154.3 d	65.53 cd	3.15 cd
1	50.00	0.00	153.7 d	64.92 d	3.08 d
5	55.00	0.00	144.3 e	65.67 bcd	3.23 ab

*medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente entre sí ($p < 0.05$) según la Prueba de Tukey

Tabla 2: Resumen de la prueba de significación de medias (Tukey) de las variables penetrabilidad (dureza del gel), grados brix y potencial de hidrógeno (pH) de los doce tratamientos

de estos se desprende que para la variable penetrabilidad se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) para tratamientos: contenidos de azúcar (A), contenido povidexrosa (B) e interacción de los contenidos de azúcar y povidexrosa (AxB). Estos resultados demuestran que hubo efectos positivos de los diferentes contenidos de azúcar y povidexrosa en los tratamientos estudiados en relación con la dureza del gel.

Por otra parte, para grados brix se encontraron efectos significativos ($p < 0.05$) para el factor principal azúcar y no significativos para povidexrosa; asimismo, la interacción de los niveles de azúcar y povidexrosa fue estadísticamente significativa. Estas respuestas para la variable grados brix, mostraron que la utilización de diferentes niveles de povidexrosa no presentaron una respuesta positiva en la cuantificación de esta variable al considerar su efecto individual.

Del análisis de la varianza (ANOVA) para el pH se encontraron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) tanto para los efectos principales azúcar y povidexrosa como para la interacción de azúcar y povidexrosa, lo que es un indicativo de que el pH de los diferentes tratamientos bajo estudio mostró marcadas variaciones.

Los resultados significativos en las tres variables bajo estudio para la interacción entre los niveles de azúcar y de povidexrosa, nos indican que los factores no son independientes, sin más bien que actúan conjuntamente y que esta interacción implica que las diferencias de las respuestas en el factor B povidexrosa, varían de acuerdo al nivel de azúcar, factor A.

Pruebas de significación

En la tabla 2 se muestran las pruebas de separación de medias de Tukey para las tres variables cuantificadas de respuesta. Se encontraron diferencias estadísticas significativas para penetrabilidad; presentando mayores magnitudes para esta variable los tratamientos 12, 4 y 8 siendo iguales estadísticamente y ocupando el mismo rango

de significación. Al comparar estos valores con los de penetrabilidad de la jalea de mora marca "Snob" 193 (1/10 mm) se observa que son en magnitud similares a los de la jalea comercial.

Para la variable grados brix, los resultados según la prueba de Tukey permitieron diferenciar a los tratamientos, mostrando las combinaciones 9, 7 y 10 valores superiores y al compararla con el parámetro establecido en la Norma CODEX STAM 296-2009 para confituras, jaleas y mermeladas que establece un rango de "60 a 65 % o superior", estos tres tratamientos mostraron valores superiores al 65 % y estadísticamente ocuparon el mismo rango de significación.

De acuerdo con la prueba de Tukey para la variable pH, los tratamientos 8, 4 y 5 mostraron los valores más altos, sin embargo, todos los tratamientos estuvieron dentro del rango de pH establecido con un mínimo de 2.8 y un máximo de 3.5 [6].

Evaluación sensorial y estudio de aceptabilidad del producto

Con base a los valores de ponderación asignados a las variables penetrabilidad [3]; grados brix [2] y pH [1] se seleccionaron los tratamientos 8 (55 g de azúcar / 0.90 povidexrosa), 12 (60 g de azúcar / 0.90 povidexrosa) y 4 (50 g de azúcar / 0.90 povidexrosa). Los cuales fueron considerados para la etapa de evaluación sensorial y estudio de aceptabilidad del producto. La codificación de las muestras se la realizó mediante el programa "Desing Express"; la muestra A, tratamiento 4, se codificó como (394), la B, tratamiento 8, como (170), y la C, tratamiento 12 como (622). En general las respuestas fueron similares para el nivel de agrado de las tres muestras de la jalea de guanábana expresada por los 100 consumidores. Los resultados se concentraron mayormente en las categorías de 6 a 9 de la escala hedónica, lo que es un indicativo de que las tres muestras tuvieron aceptación en los consumidores; sin embargo, la muestra 622 (C) tuvo el mayor nivel de agrado.

FV	GL	CM	Fc
Total	299	–	–
Jueces	99	3.272	2.56*
Tratamientos	2	2.425	1.89 NS
Error experimental	198	1.278	

*Significativo $p < 0.05$ NS No significativo $p < 0.05$

Tabla 3: Resumen del análisis de varianza (ANOVA) del nivel de aceptación de tres tratamientos seleccionados

ANOVA de dos vías

En la tabla 3 se presenta el ANOVA de dos vías de la prueba del nivel de aceptación de los tres tratamientos (muestras). Se encontraron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) para jueces pero no para tratamientos, es decir que las tres muestras presentaron un nivel de agrado similar para los consumidores.

Modelo Thurstoniano

La tabla 4 presenta los valores d' y los límites máximo y mínimo obtenidos a partir de pares de muestras para la escala hedónica de 9 puntos de acuerdo con el modelo Thurstoniano.

Los jueces expresaron un nivel de agrado similar tanto para la muestra B como para la C, por esta razón fue el par de muestras con menor dispersión de valores. Asimismo, la mayor dispersión se encontró entre A y C y una dispersión intermedia entre A y B. En base a este análisis, los jueces expresaron un nivel de agrado similar para los pares de muestras A y B y B y C; con un nivel menor de agrado para el par A y C.

Índice R

Los valores de índice R para los pares de muestras se presentan en la tabla 5.

Los resultados del índice R determinaron que las muestras 394 (A) y 170 (B) fueron estadísticamente iguales y por lo tanto, los jueces expresaron un nivel de agrado similar; por otro lado, las muestras 394 (A) y 622 (C) presentaron diferencias estadísticas, por lo que los jueces expresaron diferentes niveles de agrado tanto para A como para C. Finalmente, la comparación entre las muestras 170 (B) y 622 (C) fueron estadísticamente iguales, y se encontraron en el límite de los valores, del nivel de agrado de la estimación de los jueces. Adicionalmente, se observó que un 67 % de jueces indicó el mismo grado de preferencia para dos muestras, y solo un 33 % de estos estableció una diferencia entre las tres muestras en el nivel de agrado.

Los resultados encontrados utilizando los tres modelos estadísticos permitieron determinar que según el ANO-

Pares de muestras	d'	sd'	Límite máximo	Límite mínimo
394 (A) con 170 (B)	0.203	0.18748	0.57047	-0.16447
394 (A) con 622 (C)	0.367	0.19191	0.74315	-0.000915
170 (B) con 622 (C)	0.163	0.19560	0.54638	-0.22038

Tabla 4: Comparaciones entre pares de muestras utilizando el modelo Thurstoniano para categorías de una escala de 9 puntos (ASTM E2262-03)

Pares de muestras	IR Calculado (%)	IR tabulado + 50 %
AB	47.71 NS	57.89
AC	58.80*	57.89
BC	57.82 NS	57.89

* Significativo $p < 0.05$

NS No significativo $p < 0.05$

Tabla 5: Índice R para pares de muestras [7]

VA no hubo diferencias estadísticas para el nivel de agrado entre los tres tratamientos; por otro lado, el modelo Thurstoniano indicó que la menor dispersión de valores se encontró al relacionar las muestras 170 (B) con 622 (C). Asimismo, el índice R determinó diferencias estadísticas entre las muestras 394 (A) y 622 (C). Considerando los tres modelos estadísticos evaluados se seleccionó la muestra 622 (C) con 60 g de azúcar y 0.90 g de povidexrosa, la que mostró una mayor tendencia de aceptación por parte de los consumidores, por lo cual fue la formulación final del producto para la futura producción industrial.

Conclusiones

Los resultados de este estudio determinaron la posibilidad de obtener una jalea de guanábana utilizando como fuente de fibra soluble a la povidexrosa, seleccionándose a la formulación que contenía 60 g de azúcar y 0.90 g de povidexrosa por cada 100 g de producto. El producto final evaluado sensorialmente fue de agrado de los consumidores obteniendo un promedio de 7 en la escala hedónica de 1 al 9. Se recomienda realizar análisis cuantitativos de povidexrosa de acuerdo con la norma oficial AOAC 2000.11.

Agradecimientos

Los autores del estudio agradecen la colaboración brindada por los asistentes del laboratorio de análisis de alimentos y de la planta piloto del Departamento de Ingeniería de Alimentos de la USFQ para los procesos de elaboración del producto y en la cuantificación de las variables del producto final.

Referencias

- [1] Bailey, M. 1928. "Cultivo de plantas tropicales". *Toloma Colombia Cyclopedia*.
- [2] Arango, T. 1975. "La guanábana". *Revista Esso Agrícola*, 21(2).
- [3] Avilán, L.; Leal, F.; Bautista, D. 1992. "Manual de fruticultura". *Segunda edición Tomo I. Venezuela: Ed. América*.
- [4] 296, C. S. 2009. "Norma del codex para las confituras, jaleas y mermeladas".
- [5] Craig, F.; Holden, J.; Troup, M.; Averbach, H.; Frier, I. 1998. "Povidexrose as soluble fiber: Physiological and analytical aspects". *Publication no. W-1998-0427-03 F. American Association of Cereal Chemists*, 43(5).

- [6] Arthey, D.; Ashurst, P. 1997. "Procesado de Frutas". Zaragoza: Ed. Acribia.
- [7] O'Mahony, M. 1986. "Sensory evaluation of food. Statistical methods and procedures". Copyright by Marcel Dekne Inc.
- [8] Ott, D. 1992. "Manual de laboratorio de ciencia de los alimentos". Zaragoza Ed. Acribia.
- [9] INEN-389. 1985. "Conservas Vegetales: Determinación de la Concentración del ion hidrógeno (pH)". Instituto Ecuatoriano de Normalización. Primera revisión. Ecuador.
- [10] INEN-380. 1985. "Conservas Vegetales: Determinación de Sólidos Solubles. Método Refractométrico". Instituto Ecuatoriano de Normalización. Primera revisión. Ecuador.
- [11] Sanchez, J. 2011. "Introducción al diseño experimental". Quito, Ecuador.
- [12] ASTM. 2003. "Standard Practice for Estimating Thurstonian Discriminal Distances". International Designation: E 2262 Ú 03. United States.
- [13] Bi, J. 2006. "Statistical Analyses for R - Index". Journal of Sensory Studies.

Diseño y simulación de antena inteligente asistida por GPS para un vehículo aéreo no tripulado

Francisco Cuesta¹ y René P. Játiva E.^{1*}

¹*Colegio de Ciencias e Ingeniería - Universidad San Francisco de Quito Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador.*

**Autor principal/Corresponding author, e-mail: rjativa@usfq.edu.ec*

Editado por/Edited by: Cesar Zambrano, Ph.D.

Recibido/Received: 02/05/2013. Aceptado/Accepted: 02/06/2013.

Publicado en línea/Published on Web: 28/06/2013. Impreso/Printed: 06/06/2013.

Abstract

A critical component of an Unmanned Aerial Vehicle (UAV) is the communications system. It is in charge of transmitting information from the aircraft to the base station and sending configurations to the aircraft. It is important to keep safe the communication link, considering that energy resources limit the autonomy of operation of the aircraft. For this reason, this paper presents a low complex smart antenna system that manages the transmission power of the communication system based on aircraft position using the positioning module that it is part of the equipment of the aircraft.

Keywords. UAV, Smart Antennas, GPS

Resumen

Un componente crítico de un vehículo aéreo no tripulado (VANT) es el sistema de comunicaciones. Éste se encarga de transmitir la información de la aeronave hacia la estación base y enviar configuraciones hacia la aeronave. Es importante mantener el enlace de comunicaciones, considerando que los recursos energéticos limitan la autonomía de operación de la aeronave. Por este motivo este artículo plantea un sistema de antena inteligente de baja complejidad que administre la potencia de transmisión del sistema de comunicaciones en función de la posición de la aeronave utilizando el módulo de posicionamiento que es parte del equipamiento de la aeronave.

Palabras Clave. Vehículo Aéreo no Tripulado, Antena Inteligente, GPS.

Introducción

Definimos como aeronaves no tripuladas a aviones teledirigidos remotamente o autómatas que se utilizan generalmente para tareas de monitoreo o para misiones de reconocimiento en áreas geográficas hostiles o extensas en donde se prefiere preservar el recurso humano y reducir los costos de operación. Estas aeronaves conocidas como UAVs (del inglés Unmanned Air Vehicles) se han aplicado en escenarios militares y de seguridad, y actualmente son el foco de investigaciones en aplicaciones civiles tales como: control de tráfico y control de carreteras, control de narcotráfico, fotografía aérea y catastro, detección de incendios, control de migración, asistencia y control de pesca, comunicaciones de telefonía móvil e internet. Una búsqueda rápida por Internet permite localizar proyectos relacionados en diversos estados de desarrollo en España, Argentina, Perú y Ecuador.

El desarrollo de UAVs involucra capacidades multidis-

ciplinares en áreas de Aeronáutica, Ingeniería Mecánica, Ingeniería Electrónica, de Telecomunicaciones y Control, y en etapas avanzadas de desarrollo se constituyen en autómatas que requieren incluso de inteligencia artificial no solo para su operación individual sino como parte de un conglomerado de autómatas inteligentes [1, 2]. Para su adecuada operación, se han desarrollado modelos de gestión [3], pues el desarrollo de la misión requiere de una correcta interacción entre la nave, la estación base y los subsistemas de despegue y recuperación.

Al tratarse de una aeronave autónoma, sus recursos energéticos son limitados y deben optimizarse para la operación del equipamiento de monitoreo y navegación. En la mayoría de los casos, la información obtenida por la aeronave se transmite a una estación base en tiempo real, por lo que es necesario un sistema eficiente de transmisión de datos. Sin embargo, al tener recursos energéticos limitados, el rango del enlace entre la aeronave y la estación base es un factor neurálgico a resol-

verse, pues este puede verse afectado por la presencia de interferencias, así como por las características inherentes a las señales transmitidas en su propagación entre la aeronave y la estación de control, lo cual ha llevado incluso a la propuesta de esquemas complejos de transmisión/recepción [4] para enlaces por sobre los 50 km.

Se considera que la optimización de potencia en la aeronave, además de incrementar el rango, aumentaría su autonomía de operación; por lo que se vuelve necesario mejorar el sistema de comunicaciones en la aeronave. Las características deseadas para la solución a implementarse son: bajo peso, bajo consumo de potencia y la ausencia de puntos ciegos en el área de cobertura. Una solución sencilla es la adición de amplificadores en transmisión y recepción. La utilización de amplificadores en la estación base aumentaría el rango, pero su utilización en la aeronave aumentaría el peso del equipo y la potencia consumida de forma considerable. Otra solución es la utilización de antenas de alta directividad. Sin embargo, si bien esta solución aumenta el rango, también reduce el área de cobertura. Una forma de compensar este problema es utilizar varias de estas antenas en un arreglo sectorizado; pero no existiría una optimización de potencia.

Una solución que aumenta el rango y optimiza el consumo de potencia es un arreglo de antenas; pero al igual que en el caso anterior, un arreglo presenta puntos ciegos en su área de cobertura. La diferencia entre un arreglo y una antena directiva es la capacidad de modificar el patrón de radiación a partir de la amplitud y fase de la señal de cada antena. Limitada por la disposición física de las antenas, y utilizando un sistema de procesamiento de señales, un arreglo puede anular sus puntos ciegos dinámicamente; constituyéndose en un sistema de antena inteligente.

Una antena inteligente es un arreglo de sensores en la cual un procesador determina la alimentación de cada uno de ellos para la transmisión de datos y trata la señal recibida para recuperar la señal transmitida a través del enlace. Una antena inteligente controla únicamente la amplitud y la fase de la señal transmitida o recibida de cada sensor, sin modificar la disposición espacial del arreglo. El rango angular de operación de la antena inteligente se encuentra limitado por la configuración física del arreglo y condicionado por la acción del procesador [5–7].

En la literatura que hace alusión a antenas inteligentes, una de las aplicaciones de interés es precisamente la detección del ángulo de dirección de la señal transmitida, y si bien es cierto que teóricamente, estas configuraciones podrían funcionar incluso en condiciones de obstrucción (NLOS del inglés Non Line Of Sight), el procesamiento requerido es más extenso [5–9]. El uso del módulo GPS incorporado en la aeronave permite el desarrollo de una solución menos pesada computacionalmente desde el punto de vista de nuestro procesador, con la ventaja que la estimación de la posición

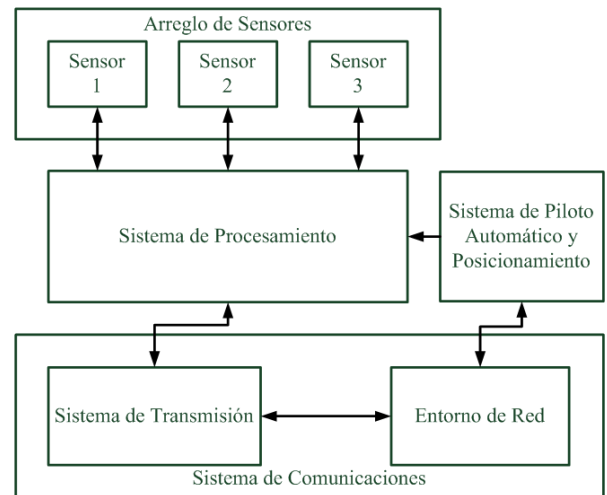


Figura 1: Arquitectura del sistema de antena inteligente.

incluye inherentemente el uso de Filtros de Kalman, con la ventaja que esto supone en términos de estabilidad en el seguimiento de la ruta [10].

Métodos

Arquitectura y funcionamiento de la antena inteligente

En la Figura 1 se muestra el diagrama funcional de la antena inteligente y su interacción con los demás sistemas a bordo de la aeronave. El sistema se conforma por el arreglo de sensores, el procesador de señales, el subsistema de posicionamiento y el sistema de comunicaciones. El sistema de comunicaciones se encarga de la modulación y conversión de datos del entorno de red. El subsistema de posicionamiento se utiliza para determinar la dirección de radiación, pues en este caso partimos del hecho de que es un sistema asistido por GPS.

El procesador de señales se encarga de asegurar la correcta extracción de la señal transmitida por la estación base a partir de las señales disponibles en el arreglo de sensores.

En el modo de transmisión, el procesador se encarga de alimentar cada sensor del arreglo en amplitud y fase con el objetivo que el arreglo amplifique la señal en determinadas direcciones y la cancele en otras.

Los sensores que conforman el arreglo propuesto son monopolos de cuarto de longitud de onda con plano de tierra, cuya ganancia se estima en alrededor de los 6 dB. También se considera que el sistema de comunicaciones es capaz de transmitir con una potencia máxima de 30 dBm.

Al utilizar cualquier antena omnidireccional, ésta irradia en todas direcciones. Por este motivo se considera que existe un uso inadecuado de la potencia, el cual degrada el rango de operación del enlace de comunicaciones. Si se consigue direccionar la potencia de tal manera de irradiar en las direcciones de interés, se optimizaría la potencia y el rango del enlace. El problema

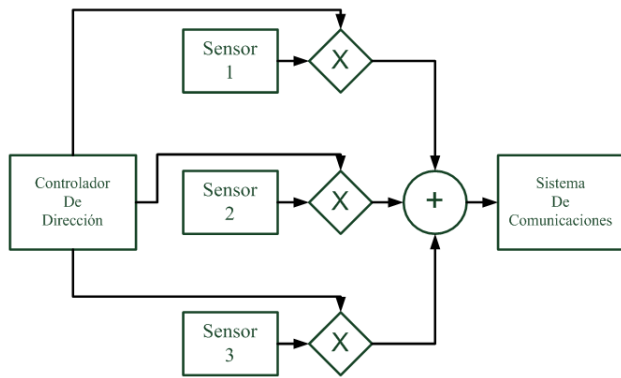


Figura 2: Diagrama de bloques del procesador para la recepción de señal.

es precisamente que al reducir el área de cobertura, podría perderse el enlace al quedar el objetivo fuera del área cubierta. La inteligencia del arreglo soluciona este inconveniente.

Procesamiento de señal en transmisión y recepción

Uno de los escenarios donde potencialmente podrían utilizarse UAV's (Unmanned Aerial Vehicle) son precisamente las reservas ecológicas, tales como el Parque Nacional Galápagos en nuestro país. Bajo el supuesto de misiones de monitoreo marítimo alrededor del archipiélago de Colón, y el uso de frecuencias que corresponden internacionalmente al espectro no licenciado y disponible para aplicaciones científicas; se trabaja a lo largo de este artículo sobre la banda de 900 MHz. En este escenario, es razonable considerar el canal de comunicaciones en condiciones de línea de vista LOS (del inglés Line Of Sight), y afectado por bajo ruido debido a la naturaleza del problema. Por lo tanto se modela el medio de transmisión únicamente por las pérdidas de propagación a 900 MHz.

Para la recepción, el procesador captura las señales recibidas por los sensores, las pondera y retarda en base a la información del controlador de dirección; son sumadas y el resultante es enviado al sistema de comunicaciones; como se muestra en la Figura 2.

Para la transmisión, la señal de salida del sistema de comunicaciones es amplificada y retardada para cada sensor en función de la información provista por el controlador de dirección; como se muestra en la Figura 3.

Diseño del Arreglo de Antenas

A pesar que existen variaciones en el ángulo de elevación entre la aeronave y la estación terrena, se considera por lo pronto que la elevación no será modificada por el arreglo, lo cual simplifica la solución.

Se realizaron simulaciones con arreglos lineales basados en el método de los polinomios de Schelkunoff [11], sin embargo el control de la dirección de radiación se mostró completamente deficiente. Finalmente se decidió modificar la distribución de los sensores para buscar simetría angular del arreglo, ubicando los sensores en

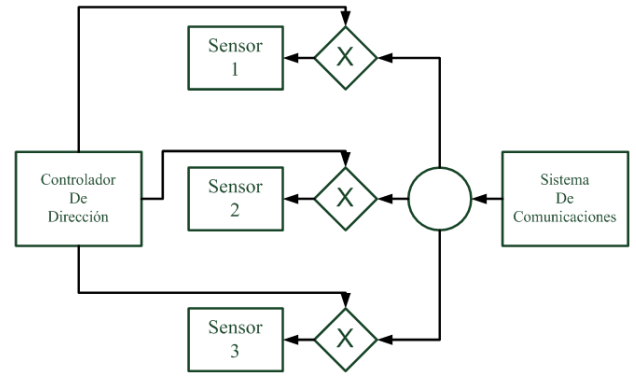


Figura 3: Diagrama de bloques del procesador para la transmisión de señal.

una circunferencia de radio determinado. Bajo esta condición, es necesario analizar únicamente un segmento angular para caracterizar completamente el arreglo. Con el objeto de reducir costos y la complejidad del sistema, se determinó que se utilizaría el mínimo requerido de tres sensores, como se muestra en la Figura 4.

Criterios de Diseño del Algoritmo del Ángulo de Radiación basado en GPS

La mayoría de las antenas inteligentes estiman la dirección del transmisor a partir de las características de la señal recibida en cada sensor; pero, gracias al módulo de posicionamiento global que tiene la aeronave no tripulada se puede determinar la dirección de radiación sin tener que estimar la señal.

En la Figura 5 se explica el diagrama de bloques del controlador de dirección del sistema de procesamiento. Los objetivos de almacenar las posiciones de la aeronave son: estabilizar la señal, y estimar el azimuth de dirección de la aeronave según su historial de coordenadas.

Definimos el azimuth como el ángulo comprendido en sentido horario entre el vector que apunta al norte y la dirección de interés desde un centro de referencia; En este caso, el centro de referencia es la posición actual de la aeronave.

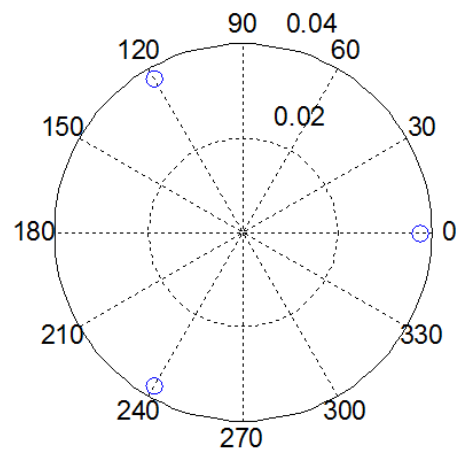


Figura 4: Disposición de los sensores en el arreglo en el plano xy: sensor 1 a 0°, sensor 2 a 120° y sensor 3 a 240°.

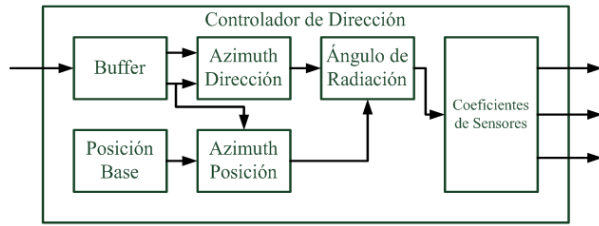


Figura 5: Diagrama de bloques del Controlador de Dirección

Los azimuts determinados son los denominados azimut de posición, el cual referencia la estación base desde la aeronave; y el azimut de dirección que referencia la dirección de la aeronave a partir del historial de coordenadas.

El cálculo del ángulo de radiación se obtiene mediante la diferencia entre el azimut de posición y el azimut de dirección, como se muestra en la Figura 6. Utilizando un algoritmo de control según el ángulo de radiación se determinan los coeficientes para cada sensor.

El reto del controlador de dirección se encuentra en el algoritmo de cálculo del azimut. Para ello se utiliza un punto auxiliar, y se asume que existe un triángulo plano conformado por el centro de referencia, el punto objetivo y el punto auxiliar. Las coordenadas del punto auxiliar es la latitud del centro de referencia y la longitud del punto objetivo. Para obtener la distancia entre puntos se utiliza la Ecuación 1.

$$d = R_T \arccos \left[\begin{array}{c} \cos(Lat_1) * \cos(Lat_2) * \\ \cos(Long_1 - Long_2) \\ + \sin(Lat_1) * \sin(Lat_2) \end{array} \right] \quad (1)$$

Donde d es la distancia en kilómetros entre los puntos P₁(Lat₁,Long₁) y P₂(Lat₂,Long₂), siendo R_T el radio terrestre en kilómetros [12]. Conocidas las distancias, se calcula el ángulo “γ” entre la paralela y la línea entre el centro y el objetivo. Para convertir γ en el ángulo de azimut en sentido horario “α” es necesario aplicar criterios basados en la posición del objetivo relativa al centro de referencia, como se muestra en la Tabla 1.

Modelamiento de las señales en el Arreglo de Antenas

Para simular el funcionamiento del arreglo de sensores se utilizaron la ecuación de intensidad de radiación en campo lejano en la Ecuación (2) que dependen de los

Posición Relativa	Signo Diferencia Latitud	Signo Diferencia Longitud	Azimuth α (grados)
Noreste	Positivo	Positivo	90° - γ
Sureste	Negativo	Positivo	90° + γ
Suroeste	Negativo	Negativo	270° - γ
Noroeste	Positivo	Negativo	270° + γ

Tabla 1: Criterios para el cálculo del ángulo de azimut

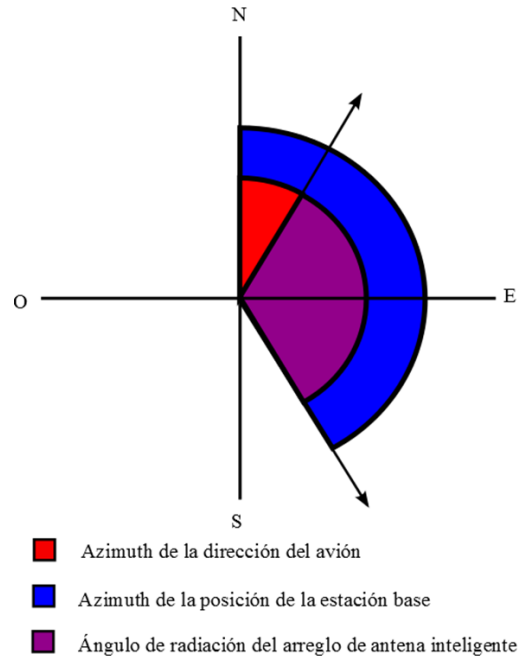


Figura 6: Esquema de cálculo de ángulo de radiación del arreglo de antenas.

parámetros f_θ y f_ϕ que se expresan en las Ecuaciones (3) y (4); siendo theta el ángulo de elevación y phi el ángulo de dirección en coordenadas esféricas. Las componentes de J_x , J_y y J_z son las transformadas de Fourier de la corriente que circula por la antena modelada en coordenadas cartesianas [11–15]. El modelamiento de una antena puntual de en el centro de coordenadas se modela en la Ecuación (5) y (6).

$$U(\theta, \phi) = \frac{15\pi}{\lambda^2} [|f_\theta|^2 + |f_\phi|^2] \quad (2)$$

$$f_\theta = \cos(\theta) \cos(\phi) J_x + \cos(\theta) \sin(\phi) J_y - \sin(\theta) J_z \quad (3)$$

$$f_\phi = -\sin(\phi) J_x + \cos(\phi) J_y \quad (4)$$

$$J = \begin{cases} J_x = 0 \\ J_y = 0 \\ J_z = i_0 * F \{ \sin(K_z * z) \delta(x) \delta(y) \} \end{cases} \quad (5)$$

$$\begin{aligned} z &= r \cos(\theta) \\ x &= r \sin(\theta) \sin(\phi) \\ y &= r \sin(\theta) \cos(\phi) \end{aligned} \quad (6)$$

Dado que el control no estima la señal recibida y aprovecha la señal GPS, el algoritmo de coeficientes puede trabajar en configuraciones preestablecidas del arreglo. Esto cataloga a la antena inteligente como una antena de conformación de haz conmutado.

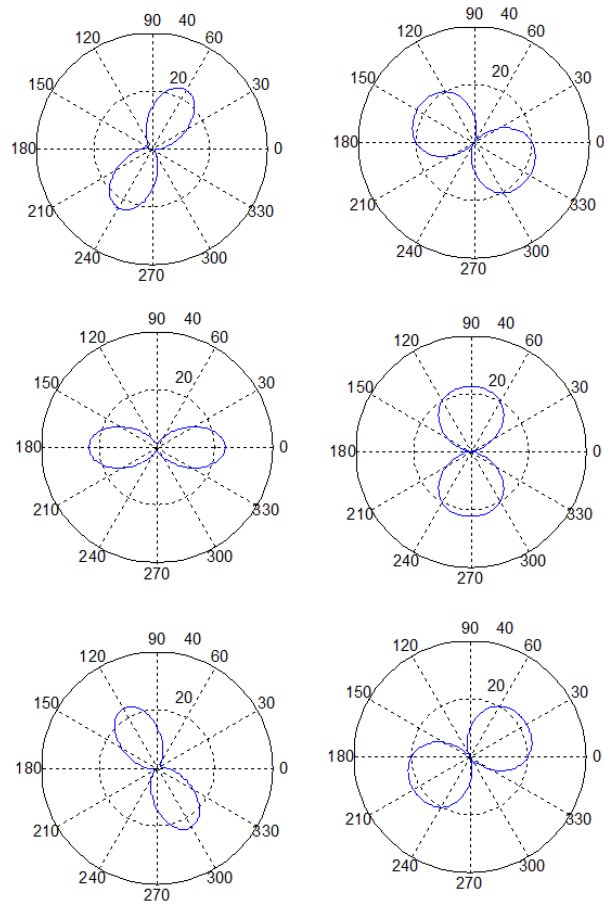


Figura 7: Ganancia del arreglo en magnitud para las configuraciones broadside (a la izquierda) y endfire (a la derecha) para las combinaciones de sensores 1 y 2 (Superior), 2 y 3 (Medio); y 3 y 1 (Inferior).

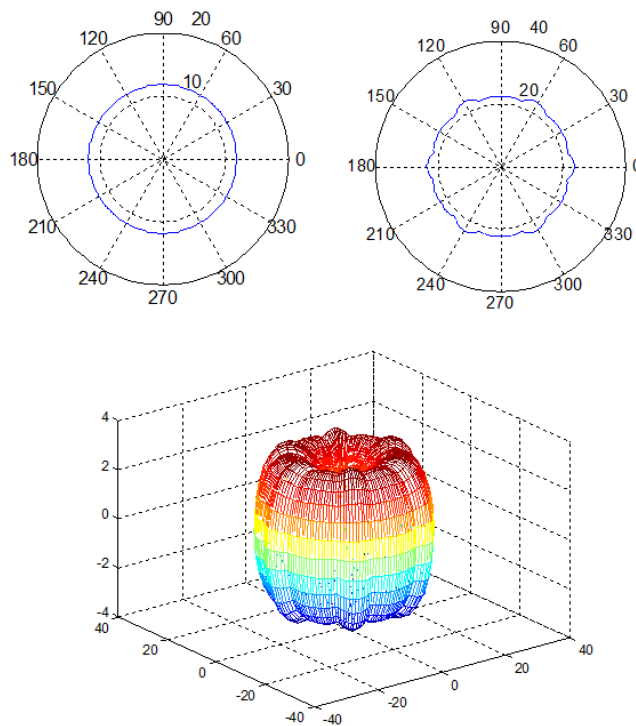


Figura 8: Superior: Comparación en vista superior de los patrones de radiación. Izquierda: Patrón de radiación de una antena. Derecha: Patrón de radiación de la antena inteligente. Inferior: Patrón de radiación de la antena inteligente en tres dimensiones.

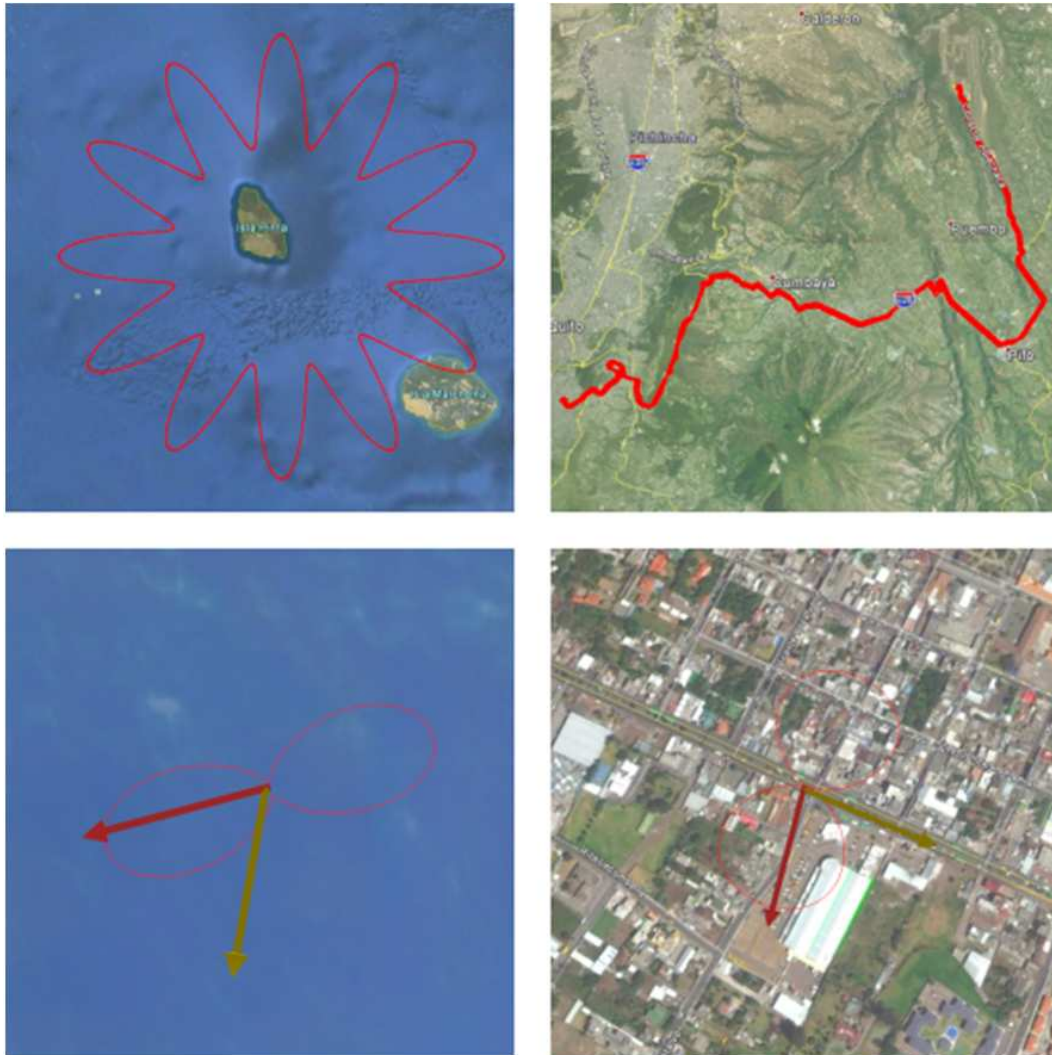


Figura 9: Patrón de radiación en función de la trayectoria. Izquierda: Simulaciones en el escenario generado con Matlab. Derecha: Simulaciones a partir de la base de datos registrados. Superior: Trayectorias de la aeronave. Inferior: relaciones entre la dirección en la cual se desplaza la aeronave (flecha amarilla), la dirección en la cual se encuentra la estación base (flecha roja), y el patrón de radiación activo (en color rojo).

Las configuraciones preestablecidas de los arreglos provienen de un par de sensores activos en configuraciones “broadside” y “endfire”. Una configuración broadside permite radiar a la dirección ortogonal de la recta formada por los sensores al alimentarlos con la misma señal, mientras que una configuración endfire irradia en la misma dirección a la recta formada por los sensores, mediante la alimentación desfasada de los sensores.

El objetivo de la simulación es determinar los factores característicos del factor de arreglo combinado, como son la directividad y la ganancia del arreglo de sensores. Es necesario por tanto discriminar los efectos del modelo del sensor utilizado en el arreglo, para lo cual se lo compara con el patrón de radiación de la antena modelada en las Ecuaciones (5) y (6). Para asegurar que la potencia de alimentación sea mantenga constante en ambos modelos, se utiliza la Ecuación (7).

$$|i_{ef}| = \sqrt{\frac{|i_0|^2}{\sum_{k=1}^n |a_k|^2}} \quad (7)$$

Donde i_{ef} es la corriente efectiva en el arreglo a partir de la corriente de la antena única i_0 y en función de la magnitud de corriente de cada sensor a_k . La corriente en cada sensor es igual al producto entre el coeficiente a_k y la corriente efectiva i_{ef} .

Resultados y Discusión

Ganancia de arreglos individuales y Ganancia compuesta de la antena inteligente

Los resultados de la simulación de configuraciones broadside y endfire para cada par de sensores alimentados se muestran en la Figura 7.

Utilizando el controlador de coeficientes es posible “mostrar” el arreglo combinado de las 6 configuraciones de antenas en función del ángulo de radiación, como se muestra en la Figura 8 junto con el modelo de antena única.

Algoritmo del Ángulo de Radiación

Para la simulación de la nave en vuelo se utilizaron los programas Matlab y Google Earth, además del toolbox de Google Earth para Matlab [16, 17]. Los resultados de las simulaciones se muestran en la Figura 9.

Se manejaron dos escenarios: el primero, en el cual las trayectorias se generan en Matlab; y el segundo con trayectorias extraídas de una base de datos a través de un dispositivo móvil GPS asistido. En ambos escenarios se envían las coordenadas al controlador de dirección.

El dispositivo utilizado para la captura es un teléfono celular basado en Android con la aplicación Google MyTracks. Los parámetros de captura son de una distancia de captura mínima de 5 metros, una distancia máxima de 200 metros, y una precisión del GPS de 200 metros, después de la cual se rechazan valores del GPS. Estos parámetros son adecuados para un escenario generado por un auto que se dirige a través de una autopista.

Conclusiones

A partir de los datos de la simulación del arreglo, se confirma que se irradia hacia cualquier dirección, en base a configuraciones broadside y endfire, con un valor de ganancia alrededor de 3 dB, como se observa en la figura 8; que se explica a partir de la Ecuación (7). Si no se procede a la normalización de potencia, la ganancia se estima en 6 dB: 3 dB correspondientes a la configuración del arreglo, y 3 dB correspondientes a la duplicación de potencia en la alimentación. Según la Ecuación (7), si se aumenta el número de sensores activos, podría aumentarse la ganancia hasta algo más de 4.5 dB. La directividad de la antena inteligente se determina a partir de los modos broadside y endfire. En el modo Broadside se tiene un ancho de haz cercano a los 60° , y en el modo endfire cercano a los 120° . Aunque el uso de los modos endfire es suficiente para garantizar una cobertura omnidireccional con una ganancia de 3dB, se utilizan también los modos broadside para mejorar el nivel medio de ganancia.

La estabilidad del arreglo dependerá drásticamente de la estabilidad y el error en los datos del receptor GPS. Sin embargo, el error en las coordenadas de posición no imposibilita utilizar el azimut de posición. El mayor inconveniente se encuentra en determinar el azimut de dirección, necesario para determinar el ángulo de radiación. Para solventar el error, es necesario utilizar un receptor de GPS robusto que establezca la información, de lo contrario se tendría que mejorar los algoritmos de procesamiento en el controlador de dirección.

Otro inconveniente detectado en el algoritmo, se descubre cuando la aeronave se encuentra detenida, y por

lo tanto no es posible detectar la dirección de radiación por medio de la diferencia de coordenadas. Este escenario es más probable en el momento de despegue de la aeronave. Una alternativa para solucionar este inconveniente se constituye el utilizar una antena independiente al arreglo y que se conecte directamente con el sistema de comunicaciones, lo cual es factible en un receptor MIMO (del inglés Multiple Input-Multiple Output). También se podría utilizar únicamente uno de los sensores del arreglo, aumentando la inteligencia en el controlador de dirección. También sería factible estimar el ángulo de radiación a partir de la estimación de la DOA a partir de métodos de análisis espectral.

Uno de los retos principales del arreglo se encuentra en el desarrollo del plano de tierra de los monopolos. Es necesario que exista un plano de tierra lo suficientemente grande para su funcionamiento adecuado, pero en una aeronave las superficies planas y abiertas son limitadas. Se necesita llegar a un compromiso entre los requerimientos técnicos del arreglo y las posibilidades de implementación.

El algoritmo de cálculo de azimut se sustenta en la utilización de un punto auxiliar y las consideraciones de un triángulo plano. La complejidad del algoritmo de detección del ángulo de radiación dependerá de la estabilidad de los datos y de la posibilidad de asumir una proyección sobre un espacio plano en lugar de un espacio esférico.

Las simulaciones, y otras pruebas realizadas con datos reales, demuestran un funcionamiento consistente entre los algoritmos de ángulo de radiación y el algoritmo de control de configuración del arreglo. La evidencia muestra que la dirección del arreglo nunca se encuentra fuera de los patrones de radiación de las diferentes configuraciones.

Referencias

- [1] Doherty, P. 2005. “Knowledge Representation and Unmanned Aerial Vehicles”. *Proceedings of the IEEE/WIC/ACM International Conference on Intelligent Agent Technology*, Doi: 10.1109/WI.2005.89.
- [2] Chaumette, S.; Laplace, R.; Mazel, C.; Mirault, R.; Dunand, A.; Lecoutre, Y.; Perbet, J. 2011. “CARUS, an operational Retasking Application for a Swarm of Autonomous UAVs: First Return of Experience”. *Military Communications Conference*, Doi: 10.1109/MIL-COM.2011.6127613.
- [3] Alexander, S. 1994. “A mission management system architecture for cooperating air vehicles”. *Proceedings of the IEEE National Conference Aerospace and Electronics Conference*, 1:156 – 163.
- [4] Edrich, M.; Schmalenberger, R. 2002. “Combined DSSS/FHSS Approach to Interference Rejection and Navigation Support in UAV Communications and Control”. *IEEE 7th Int. Symp. On Spread-Spectrum Tech. and Appl.*, 3:687 – 691.

- [5] Bellofiore, S.; Balanis, C.; Foutz, J.; Spanias, A. 2002. "Smart-Antenna Systems for Mobile Communication Networks Part 1: Overview and Antenna Design". *IEEE Antennas and Propagation Magazine*, 44(3):145 – 154.
- [6] Bellofiore, S.; Foutz, J.; Balanis, C.; Spanias, A. 2002. "Smart-Antenna Systems for Mobile Communication Networks Part 2: Beamforming and Network Throughput". *IEEE Antennas and Propagation Magazine*, 44(4):106 – 114.
- [7] Stoica, P.; Moses, R. 1997. "Introduction to Spectral Analysis". *Prentice Hall*.
- [8] Játiva, R.; Vidal, J. 2009. "Estimación del Tiempo de Llegada en un Canal Rayleigh desde una perspectiva de la Cota Inferior de Cramer-Rao". *Revista Avances en Ciencias e Ingenierías*, 1:5 – 10.
- [9] Játiva, R.; Vidal, J. 2012. "Cota Inferior de Cramer-Rao en la Estimación del Tiempo de Llegada en un Canal Rice". *Revista Avances en Ciencias e Ingenierías*, 4(1): C14 – C21.
- [10] Proaño, S.; Játiva, R. 2009. "Seguimiento de dispositivos móviles en un sistema de comunicaciones móviles celulares". *Revista Avances en Ciencias e Ingenierías*, 1.
- [11] Balanis, C. 2005. "Antenna Theory: Analysis and Design". 2ed. *John Wiley & Sons*.
- [12] Cardama, A. 2002. "Antenas". *Politecnos Series*. 2^o edición. *Univ. Politèc. de Catalunya*.
- [13] Ulaby, F. 2007. "Fundamentals of Applied Electromagnetics". 5ed. *Pearson/Prentice Hall*.
- [14] Pozar, D. 2005. "Microwave Engineering". 3rd edition. *John Wiley & Sons*.
- [15] Orfanidis, S. 2010. "Electromagnetic Waves and Antennas". *ECE Department Rutgers University 94 Brett Road Piscataway, NJ 08854-8058*.
- [16] El-Rabbany, A. 2002. "Engineer's Guide to GPS: The Global Positioning System". *Artech House Mobile Communications Series - Artech House telecommunications library Mobile Communications Series*.
- [17] MATLAB to Google Earth Toolbox. 2007. Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics. Computational Biogeography and Physical Geography. University of Amsterdam. <http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/12954-google-earth-toolbox>.

Determinación de los parámetros hidrodispersivos de una falda acuífera mediante pruebas con trazadores

C. Fallico¹, M. F. Rivera^{2*}, A. C. Ríos², A. Molinari³, P. Santillán² y M. Salazar²

¹Universidad de Calabria, Departamento de Defensa del Suelo, Puente P. Bucci Cubo 41 B, 87036, Rende, Italia.

²Universidad Nacional de Chimborazo, Facultad de Ingeniería, Avenida Antonio José de Sucre, Riobamba EC060104, Ecuador.

³Politécnico de Milán, Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental, Piazza L. Da Vinci, 32 - 20133 Milán, Italia.

*Autor principal/Corresponding author, e-mail: fernanda.rivera@fis.unical.it

Editado por/Edited by: Cesar Zambrano, Ph.D.

Recibido/Received: 07/05/2013. Aceptado/Accepted: 02/06/2013.

Publicado en línea/Published on Web: 28/06/2013. Impreso/Printed: 06/06/2013.

Abstract

During last years the global awareness about human-health and environment risks, caused by aquifers pollution, has grown. In this context, remediation actions on contaminated groundwater has acquired large importance from both scientific and engineering viewpoint whose main aim is the restoration of health-safety values of contaminants in groundwater for human beings. Before to start any remediation action, it is essential to characterize as accurate as possible of the porous medium properties, from both the hydrodispersive and hydrodynamic point of view. Often in situ aquifers characterization requires high economic and human costs and therefore laboratory tests and modelling are usually employed for a first level of characterization. The major aim of this work is to present the results of the main hydrodispersive parameters of a phreatic aquifer artificially reproduced by a laboratory prototype in order to characterize the mass transport within the considered system. Dispersion coefficient and longitudinal dispersivity presented are obtained as a result of a series of tracer tests carried out on the model which allow to complete the hydrodynamic characterization of the reproduced aquifer.

Keywords. Aquifer, Hydrodispersive Parameters, Tracers, Dispersion Coefficient, Longitudinal Dispersivity

Resumen

Durante los últimos años se ha creado una conciencia mundial sobre los riesgos a la salud humana y al medio ambiente, producidos por la contaminación de los acuíferos. En este sentido, las acciones de remediación constituyen un elemento de fuerte interés tanto de un punto de vista científico como ingenierístico, cuyo objetivo fundamental es aquel de reconducir a condiciones seguras los niveles de concentración de los contaminantes encontrados en acuíferos. Sin embargo, antes de proceder a las acciones de remediación en sí, se vuelve fundamental una caracterización lo más precisa posible de este medio poroso, tanto desde el punto de vista hidrodinámico como hidrodispersivo. Los costos tanto económicos como humanos de una caracterización del acuífero in situ muchas veces son insostenibles, por tal motivo, la reproducción en laboratorio de un modelo de acuífero puede ser útil para efectuar un primer nivel de caracterización. Este artículo tiene como finalidad mostrar los resultados obtenidos de los principales parámetros hidrodispersivos de un acuífero freático artificial, reproducido mediante un prototipo de laboratorio, con el objeto de caracterizar el transporte de masa. El estudio se basa en estudios obtenidos de una precedente caracterización hidrodinámica del acuífero en mención. En este estudio se reportan los resultados obtenidos, en el modelo de acuífero, del coeficiente de dispersión y de la dispersividad longitudinal, a través de pruebas de trazabilidad, efectuadas en el prototipo.

Palabras Clave. Acuífero, Parámetros Hidrodispersivos, Trazadores, Coeficiente de Dispersión, Dispersividad Longitudinal

Introducción

El paso de una economía de tipo agrícola a una de tipo industrial que ha caracterizado las últimas décadas ha dado lugar a nuevos problemas relacionados con la con-

taminación ambiental y por ende la necesidad de reparación y recuperación de áreas contaminadas.

La fuerte antropización de algunas zonas, con todo lo que esto implica (zonas industriales, vertederos, etc.) ha llevado a la generación de sustancias, productos y dese-

ISSN 1390-5384



chos que se han extendido en diversas matrices ambientales, lo cual constituye un peligro para la salud del hombre y de los ecosistemas con los que entran en contacto [1]. La toma de conciencia de los riesgos asociados con este tipo de situaciones y el desarrollo de nuevos conocimientos científicos, han evidenciado la necesidad de reconducir las zonas afectadas a su estado original y reducir las concentraciones de contaminantes a niveles inocuos, a través de remediación de sitios contaminados mediante la remoción de la causa contaminante y la recuperación de los niveles aceptables de riesgo para la salud humana [2]. Las obras de remediación de sitios contaminados, debido a su complejidad, son un tema de gran interés tanto desde el punto de vista de ingeniería como desde un entorno legal y normativo.

Antes de proceder a la recuperación de un sitio contaminado es indispensable su caracterización con precisión desde el punto de vista hidrodinámico como hidrodispersivo [3]. Esto puede implicar costos considerables, por tal razón una primera experiencia puede ser limitada al estudio del acuífero mediante su reproducción en laboratorio a través de un prototipo y efectuando en este el primer nivel de caracterización.

La finalidad de este trabajo experimental es la de determinar los principales parámetros hidrodispersivos en un acuífero freático artificial, reproducido a través de un modelo físico de laboratorio, con el objeto de caracterizar adecuadamente el transporte de masa. Es importante tener presente que anteriormente se realizó una caracterización hidrodinámica detallada del mismo acuífero dentro en prototipo construido para tal fin.

De manera particular, en este estudio se presentan los resultados de la determinación, para el acuífero artificial en análisis, del coeficiente de dispersión y la dispersividad longitudinal, mediante idóneas pruebas con trazadores realizadas directamente en el modelo físico.

Los resultados presentados a continuación hacen preferencia a pruebas de laboratorio efectuadas con el objetivo de caracterizar desde un punto de vista hidrodispersivo una falda artificial reproducida a escala de laboratorio con la finalidad de estudiar la eficiencia de una barrera reactiva permeable (PRB) en el abatimiento de los metales pesados presentes en el acuífero usando como medio reactivo particulares fibras vegetales. Esta investigación es parte de un acuerdo de cooperación e intercambio entre la Universidad de Calabria (Italia) y la Universidad Nacional de Chimborazo (Ecuador).

Metodología

Ecuaciones Teóricas para la Caracterización hidrodispersivas

La metodología consistió en la caracterización del terreno muestreado en Cosenza, Calabria, Italia desde el punto de vista granulométrico, donde fue verificado el flujo laminar del mismo, determinado mediante



Figura 1: Fotografía del dispositivo utilizado "Sand Box"

el número de Reynolds $Re = \frac{Vd}{\nu}$, donde V es la velocidad efectiva del fluido, d es el diámetro eficaz (magnitud lineal que caracteriza el tamaño de los poros, o de los mismos gránulos sólidos que constituyen la matriz sólida) y ν es la viscosidad cinemática, a través de este cálculo fue comprobado que el valor de tal parámetro resulta menor que 10 [4].

Desde el punto de vista hidrodinámico del acuífero fue previamente determinando los parámetros hidrodinámicos, en particular la conductividad hidráulica, a través de pruebas de bombeo y el posterior tratamiento de datos experimentales de descensos vs tiempo, obtenidas en condiciones de movimiento no estacionario con el método de Neuman [5].

La caracterización de la hidrodispersividad

La determinación de los parámetros hidrodispersivos, particularmente el coeficiente de dispersión y la dispersividad, en el presente estudio fueron obtenidas a través de pruebas con trazadores, considerando como trazador el NaCl.

De esta manera, despreciando los fenómenos de decaimiento y adsorción – desorción, la ecuación de transporte sólido asume la siguiente expresión [6].

$$\frac{\partial}{\partial x} \left(D_{xx} \frac{\partial C}{\partial x} \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left(D_{yy} \frac{\partial C}{\partial y} \right) - \frac{\partial}{\partial x} (u_1 C) + \frac{\partial}{\partial y} (u_2 C) = S \frac{\partial C}{\partial t} \quad (1)$$

Donde:

C = concentración del contaminante [ML^{-2}] [ML^{-3}];

S = coeficiente de almacenamiento [- -]

D_{xx} = coeficiente de dispersión hidrodinámica a lo largo del eje x [L^2T^{-1}]

D_{yy} = coeficiente de dispersión hidrodinámica a lo largo del eje y [L^2T^{-1}]

u_1 = componente de la velocidad a lo largo de x [LT^{-1}]

u_2 = componente de velocidad a lo largo de y [LT^{-1}]

En la hipótesis de movimiento monodimensional, inmisión impulsiva, superficie libre no significativamente perturbada por la presión generada mediante las pruebas de bombeo, en condiciones de eventual movimiento forzado y dispersión transversal despreciable, la solución de la Ec. 1 toma la siguiente forma [7].

$$C(x, t) = \frac{M/\omega}{\sqrt{4\pi Dt}} \cdot e^{-\frac{(x-ut)^2}{4Dt}} \quad (2)$$

Donde:

M = masa del trazador por unidad de sección transversal total [M];

x = distancia entre el punto de inmisión del trazador y el de muestreo [L];

t = tiempo [T];

α = dispersividad [L];

u = velocidad real [LT^{-1}];

D = coeficiente de dispersión [L^2T^{-1}];

C = concentración en el tiempo t genérico [ML^{-1}];

ω = porosidad [-]

Si se asumen las siguientes variable reducidas:

$$t_R = \frac{ut}{x}$$

$$C_R = \frac{C(x,t)}{C_{MAX}(x)}$$

Donde:

C_{MAX} = concentración máxima [ML^{-1}].

La Ec. 2 se convierte en la siguiente:

$$C_R = \frac{K}{\sqrt{t_R}} e^{\left[-\frac{P_e}{4t_R}(1-t_R)^2\right]} \quad (3)$$

Donde:

$$K = \sqrt{t_{R_{MAX}}} \cdot e^{\left[\frac{P_e}{4t_{R_{MAX}}}(1-t_{R_{MAX}})^2\right]}$$

$$t_{R_{MAX}} = \sqrt{1 + \left(\frac{1}{P_e}\right)^2} - \frac{1}{P_e}$$

P_e = número de Péclét [-]

Donde $P_e = \frac{V_{ef}x}{D}$

Sustituyendo en la Ec.3 los diferentes valores del número de Péclét, se obtienen las curvas teóricas que sobrepone la experimental, la identificación de la curva teórica es representativa del caso en estudio y se determina así los valores del coeficientes dispersión (D) y la dispersividad (α) [8–12] definida como $\alpha = \frac{x}{P_e}$.

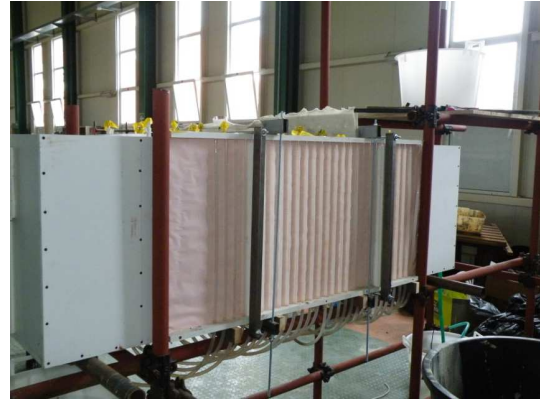


Figura 2: Sistema para la lectura de los niveles piezométricos

En cuanto concierne la velocidad de transporte en el interior del medio poroso, después de haber determinado un flujo laminar y estacionario, la velocidad se obtiene a partir de la ley de Darcy:

$$V_D = -k \frac{\Delta h}{L} \quad (4)$$

mientras que la velocidad efectiva se determina mediante la siguiente ecuación [4, 9]:

$$v_{ef} = \frac{\int_0^\infty \frac{x}{t} C(t) dt}{\int_0^\infty C(t) dt} = x \frac{I_3}{I_2} \quad (5)$$

Donde:

t = tiempo [T];

$C(t)$ = concentración del contaminante en el tiempo t [ML^{-2}];

$$I_3 = \int_0^\infty \frac{1}{t} C(t) dt$$

$$I_2 = \int_0^\infty C(t) dt$$

V_D y de V_{ef} se pueden utilizar para determinar la porosidad del medio estudiado mediante la siguiente ecuación [4, 9]:

$$\omega = \frac{V_D}{V_{ef}} \quad (6)$$



Figura 3: Sistema de bandejas móviles para regularizar la carga

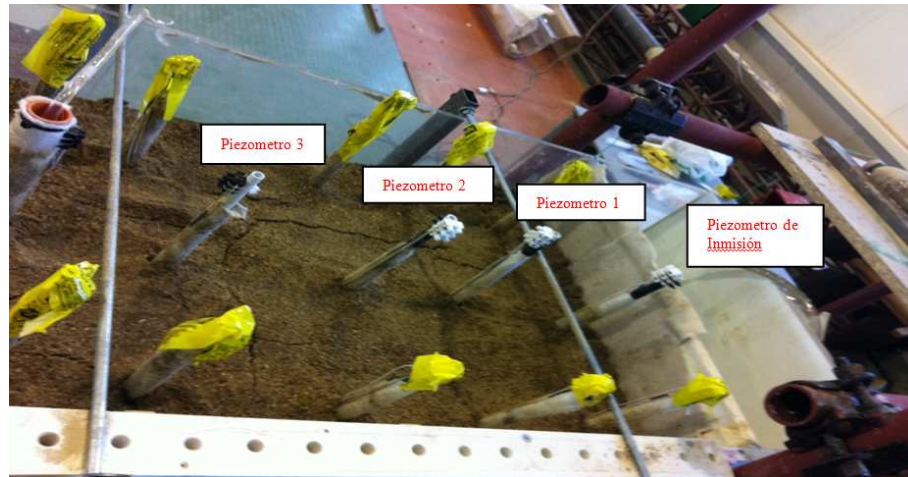


Figura 4: Dispositivo usado para la prueba con trazadores, con pozo de bombeo, piezómetro de inmisión, y pozos de observación.

Modelo experimental

La fase experimental se llevó a cabo en un acuífero subterráneo artificial especialmente diseñado mediante un modelo físico situado en el Laboratorio de Defensa del Suelo de la Universidad de Calabria (Italia) y exactamente reproducido en el Laboratorio de Servicios Ambientales de la Universidad Nacional Chimborazo (Ecuador). Este modelo consiste en una caja en forma de paralelepípedo de dimensiones 0,60 m x 2 m x 0,60 m, descubierto en la parte superior y colocado a 1 m a partir de la superficie suelo sostenido con una estructura metálica con tubos de conexión.

La parte posterior y los dos paneles laterales están hechos de PVC (cloruro de polivinilo), del espesor de 2 cm, mientras que la parte delantera es hecha de una lámina de plexiglás transparente de espesor 1 cm que permite la inspección visual del experimento.

En correspondencia de las dos extremidades del paralelepípedo han sido colocadas dos tanques cuya altura se puede regular para fijar la gradiente de la carga hidráulica entre los dos extremos, fijando de esta manera las condiciones de flujo al interno del modelo. Al interno de la caja están presentes una serie de piezómetros aforados recubiertos de un geotextil usado para impedir la obstrucción de los foros por parte de la arena colocada dentro de la caja.

Una fotografía del dispositivo en cuestión se muestra en la Figura 1.

El modelo fue equipado con veinte y siete piezómetros, dispuestos a lo largo de tres filas de nueve, que consisten en tubos de plástico rígido de largo 0.60 m, de diámetro 0.008 m, perforado a lo largo de toda su longitud con una distancia entre ejes de 0.05 m y recubiertos con el mismo geotextil utilizado en las paredes del modelo. Cada piezómetro, fue instalado en el interior de un agujero hecho en la parte inferior de la caja de arena, y conectado al exterior del modelo con un tubo de plástico transparente y flexible, con el cual es posible determinar la carga hidráulica, midiendo el nivel de agua en

los tubos de plástico transparentes dispuestos en la parte posterior del modelo, por encima de una hoja de papel cuadrado, como se indica en la Figura 2.

En el compartimiento central ha sido realizado un pozo, a través de un tubo de PVC con un diámetro de 0.030 m, el cual está también cubierto por geotextil, con orificios realizados cada 0.03 m a lo largo de toda su profundidad. Este pozo está ubicado en el centro de la caja, con el fin de tener el mismo número de piezómetros en ambos lados y, por lo tanto, en posición útil cualquiera que sea la dirección del flujo de agua. Para garantizar una carga constante en los tanques laterales, se ha pre-dispuesto un sistema de bandejas móviles conectadas al modelo. Cada una de las bandejas móviles, que sirve para asegurar la carga constante en los compartimientos laterales, tienen la capacidad de deslizarse verticalmente a lo largo de un carril fijado en la pared de los tanques de carga y descarga y se divide en dos compartimientos, uno de los cuales, conectado hidráulicamente con el sistema, viene alimentado continuamente y está equipado con un rebosadero para mantener un nivel de agua constante en el interior, como se indica en la Figura 3.

Para la caracterización hidrodispersiva, se hizo una prueba de trazadores con movimiento forzado, bombeando desde el pozo central con un caudal constante de 0.838 m³/d, con ayuda de bomba peristáltica de pequeña potencia. Utilizando para la inmisión del trazador el piezómetro derecho más lejano del pozo. Se prepararon 100 ml de una solución de NaCl de 80 g/l, que fue inyectada en el piezómetro en cuestión en un corto tiempo [13]. Sucesivamente, la prueba es de tipo continuo realizando lec-

Distribución granulométrica	
Tipo de Suelo	%
Grava	17.5
Arena	82.5
Fango	0.0
Arcilla	0.0

Tabla 1: Resultados de la distribución granulométrica del terreno

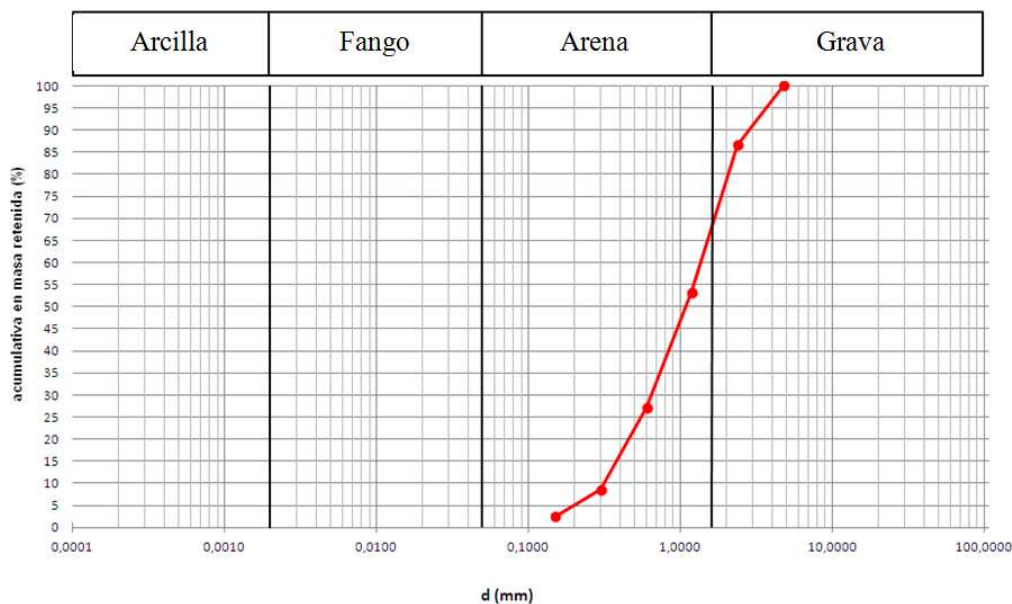


Figura 5: Clasificación granulométrica del terreno en estudio

turas de conductividad eléctrica, por medio de un conductivímetro Modelo HI 9033 Multi-range, y determinando a través de este los correspondientes valores de concentración del trazador, desde las muestras tomadas, cada vez, en los 3 piezómetros de medición alineados en el modelo, por medio de una jeringa provista de un tubo de goma especialmente preparado [14]. Los pozos de bombeo y los pozos de observación se muestran en la Figura 4.

Los piezómetros de observación n.1, n. 2 y n. 3 están alejados del piezómetro de inmisión 0.15 m, 0.30 m 0.45 m respectivamente.

Verificada la laminaridad y la estacionariedad de movimiento ($Re \cong 0,2 < 10$), mediante la Ec.4 se determina la velocidad de Darcy V_D y mediante la ecuación (5) la velocidad efectiva V_{ef} . Finalmente, mediante la Ec.6, se obtiene la porosidad del medio.

Sucesivamente se repitió la prueba con el trazador con un caudal, igual a $0.616 \text{ m}^3/\text{d}$. Seguidamente fue modificado el espesor de la capa freática, llevándola a 0.282 m, y luego fueron repetidas las pruebas con el trazador con los mismos dos caudales asumidos anteriormente, es decir, $0.838 \text{ m}^3/\text{d}$ y $0.616 \text{ m}^3/\text{d}$.

Análisis granulométrico

El terreno utilizado (medio poroso) fue sometido a un análisis granulométrico cuyos resultados son presentados en la Tabla 1, mientras que la Figura 5 muestra la curva granulométrica correspondiente. Estos resultados permiten definir el medio poroso considerado como arena.

El compartimiento central del modelo fue llenado con tal terreno a una altura de aproximadamente 0.50 m y se ha hecho una inmisión de agua para simular un acuífero

freático a una altura de aproximadamente 0.408 m, sucesivamente se repitió la prueba con una altura de la falda de 0.282 m.

Resultados y Discusión

Después de la caracterización hidrodinámica del terreno para la estimación de la conductividad hidráulica mediante pruebas de flujo se ha obtenido un valor de $1.27 \times 10^{-6} \text{ m/s}$.

Los valores de la velocidad efectiva de Darcy y la porosidad, obtenidos en correspondencia de cada piezómetro, son reportan en la Tabla 2.

El muestreo efectuado en cada uno de los piezómetros ha hecho posible obtener las curvas de restitución para cada uno de los casos examinados, es decir distintos espesores del acuífero y diversos caudales de bombeo. En la Figura 6 se muestran las curvas de restitución en términos de variables reducidas para cada piezómetro y para cada una de las hipótesis formuladas.

Para cada uno de las pruebas de trazabilidad realizadas se ha efectuado la superposición con las curvas teóricas obtenidas cambiando el número de Péclet con la ecuación (4), válido en el caso de un movimiento uniforme de una dimensión y colocación impulsivo. En la Figura 7 se muestran los gráficos de prueba para cada uno de rastreo con superposiciones con la finalidad de poder determinar el valor del número de Péclet (P_e) para cada una de las pruebas de trazabilidad realizadas, relativas a las diversas configuraciones consideradas en el sistema experimental.

Para encontrar el valor del número de Péclet, y por lo tanto la curva teórica que mejor se sobrepone con la curva experimental, se procedió tomando como valor de

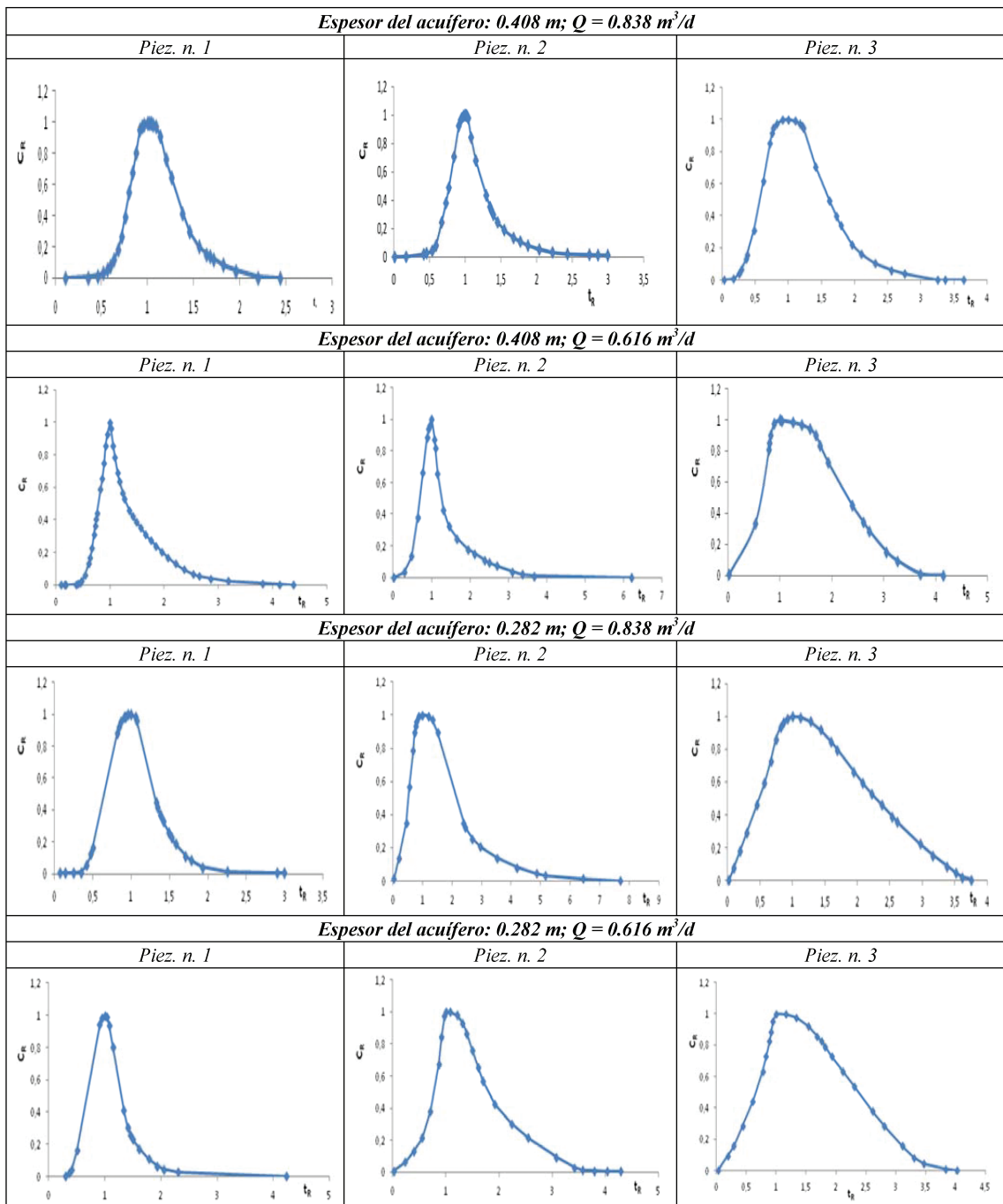


Figura 6: Curvas de restitución obtenidas en los tres piezómetros en estudio, para cada uno de los dos espesores del acuífero y para cada uno de los caudales de bombeo considerados

dicho parámetro aquel que minimiza el error de superposición entre las dos curvas. Para hacer este método se adoptó el método de error estándar (SE), que describe la incertidumbre en la estimación de un valor estadístico. SE es por lo tanto, en este caso, una estimación de la variabilidad de la desviación estándar de los parámetros considerados relativos a la muestra, una medida de la imprecisión de las variables reducidas C_R y dt_r , se obtiene como diferencia en valor absoluto entre los valores de estos parámetros relacionados con la curva experimental y la teórica [15]. El error estándar se representa

mediante la siguiente expresión [16]:

$$SE = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \tag{7}$$

Donde:

σ = desviación estándar de la población;

n = número de valores considerados en la muestra (hasta el valor máximo de C_R). En la Figura 8 se muestran para mayor claridad del gráfico $SE - P_e$ relativo

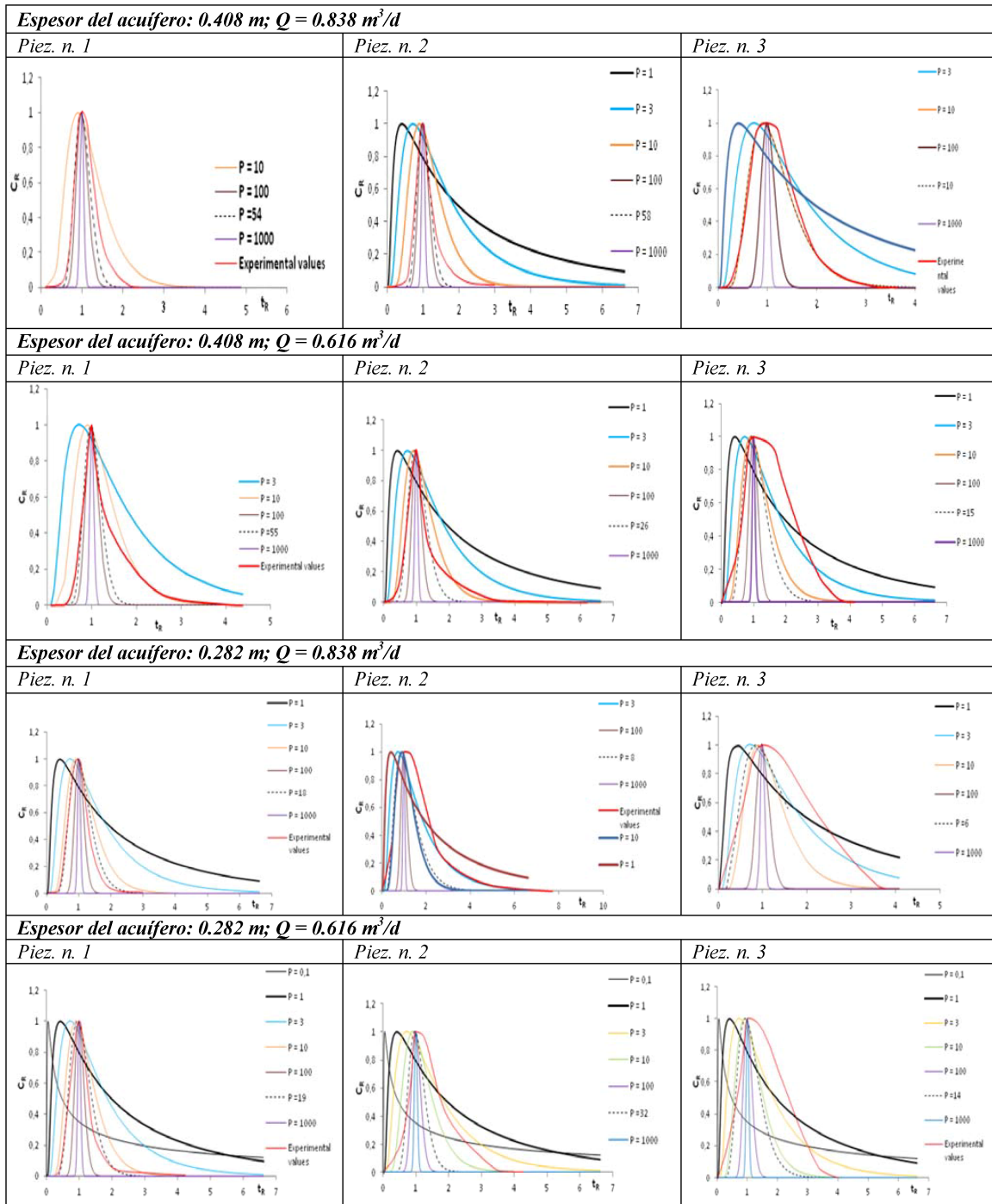


Figura 7: Superposición de las curvas experimentales con las teóricas para los tres pozos en estudio, para cada uno de los dos grosores del acuífero y para cada de los dos caudales de bombeo considerados

al piezómetro No. 1 y a la prueba de trazadores realizada con el espesor del acuífero igual a 0.408 m y caudal 0.616 m³/s.

Recordando que: $P_e = \frac{V_{ef}x}{D}$, donde V_{ef} es la velocidad efectiva y x la distancia entre el punto de inmisión y el de observación y D el coeficiente de dispersión, se calcula el último parámetro mediante la siguiente expresión:

$$D = \frac{V_{ef}x}{P_e} \tag{8}$$

Análogamente, se recuerda que siendo $D = V_{ef} \cdot \alpha$, la expresión de dispersividad es la siguiente:

$$\alpha = \frac{x}{P_e} \tag{9}$$

Mediante las ecuaciones (9) y (10) se determinaron, los

Espesor de la falda acuifera (m)	Piezometro	Q (m ³ /d)	V _D (m/d)	V _{eff} (m/d)	ω
0.408m	n° 1	0.838	3.423	4.507	0.759
	n° 2				
	n° 3				
	n° 1	0.616	2.516	3.202	0.785
	n° 2				
	n° 3				
0.282m	n° 1	0.838	4.963	6.359	0.780
	n° 2				
	n° 3				
	n° 1	0.616	3.717	4.497	0.826
	n° 2				
	n° 3				

Tabla 2: Valores de V_D, V_{eff} y ω en los piezómetros, para los diversos espesores de la falda en los caudales considerados

Espesor de la falda acuifera (m)	Piezometro	Q (m ³ /d)	P _e	D (m ² /s)	α (m)
0.408m	n° 1	0.838	54	0.024	0.003
	n° 2		58	0.062	0.005
	n° 3		10	0.680	0.045
	n° 1	0.616	55	0.017	0.003
	n° 2		26	0.115	0.011
	n° 3		15	0.436	0.030
0.282m	n° 1	0.838	18	0.070	0.008
	n° 2		8	0.450	0.037
	n° 3		6	1.202	0.075
	n° 1	0.616	19	0.094	0.008
	n° 2		32	0.148	0.009
	n° 3		14	0.781	0.032

Tabla 3: Valores del número de Peclet (P_e), del coeficiente de dispersión y de la dispersividad para las pruebas con trazadores efectuadas

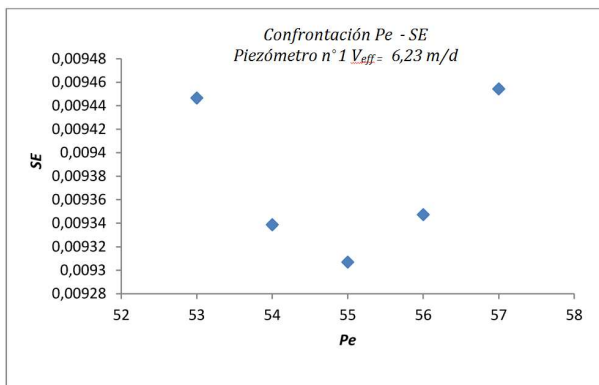


Figura 8: Individualización del valor de P_e al cual correspondiente al valor mínimo de SE (Piez. n.1, espesor del acuífero H = 0.408 m, Q = 0.616 m³/s)

valores de D y α para cada una de las pruebas con trazadores y de las configuraciones del sistema tomado en consideración, en la Tabla 3 se presentan los valores de estos parámetros.

Conclusiones

La realización de las pruebas con trazadores en un acuífero freático artificial, reproducido en laboratorio utilizando un modelo físico, ha permitido la caracterización hidrodispersiva de un trazador (sal), considerando como medio poroso identificado después de los análisis de laboratorio la arena. En esta investigación se han determinan-

do los parámetros hidrodispersivos en diferentes condiciones del nivel de la falda, en particular, se han obtenido el coeficiente de dispersión y la dispersividad.

La caracterización hidrodispersiva del acuífero artificial, en estudio, representa el punto de partida para posibles actividades de investigación futuras sobre los aspectos vinculados al transporte de masa en los medios porosos, con la finalidad de individuar las mejores técnicas de remediación para los acuíferos contaminados.

En conclusión, los resultados obtenidos muestran como la caracterización hidrodinámica efectuada en escala de laboratorio para el acuífero artificial estudiado (que representa una simplificación de los acuíferos reales) representan un instrumento válido para la comprensión de los fenómenos de flujo y transporte que se podrían verificar en escala real.

Referencias

- [1] Swoboda - Colberg, N. 1995. "Chemical contamination of the environment: sources, types and fate of synthetic organic chemicals". *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. Wiley - Liss Inc.
- [2] Ministero dell' Ambiente Italiano. 2006. Norme in materia ambientale. *Decreto Legislativo n. 152 del 3 aprile 2006. Decreto Legislativo n. 152 del 3 aprile 2006*, [D.lgs. 152/06].
- [3] Hamill, L.; Bell, F. 1986. "Ground water resource development". *Butterworth Heinemann Ltd. Oxford*.

- [4] Bear, J. 1979. "Hydraulics of Groundwater". *McGraw-Hill. New York*.
- [5] Freeze, R.; Cherry, J. 1979. "Groundwater". *Prentice - Hall Ed.*
- [6] Batu, V. 1998. "Aquifer Hydraulics: A Comprehensive Guide to Hydrogeologic Data Analysis". *Wiley*.
- [7] Sauty, J. 1978. "Identification des paramètres du transport hydrodispersif dans les aquifères par interprétation de traçages en écoulement cylindrique convergent ou divergent". *Journal of hydrology*, 39.
- [8] Bear, D.; Beljin, M.; Ross, R. 1992. "Fundamentals of ground-water modeling". *Superfund Technology Support Center for Ground Water*.
- [9] Troisi, S.; Fallico, C.; Coscarelli, R.; Caramuscio, P. 1992. "Considerazioni sulle misure sperimentali dei parametri idrodispersivi di falde sotterranee". *Proceedings of XXIII Convegno di Idraulica e Costruzioni Idrauliche. Firenze, 31 agosto - 4 settembre*.
- [10] Issar, A.; Brown, N. 1998. "Water, Environment and Society". *Times of Climatic Change*.
- [11] Custodio, E.; Llamas, M. 2001. "Hidrologia Subteranea". *Ed. Omega, 2ª ed.*
- [12] Celico, P. 1986. "Prospezioni Idrogeologiche". *Liguori Ed., Napoli*, 1.
- [13] Neuman, S. 1972. "Theory of flow in unconfined aquifers considering delayed response of the water table". *Water Resour. Res*, 8:1031 – 1045.
- [14] Xu, M.; Eckestein, Y. 1997. "Statistical Analysis of the relationships between dispersivity and other Physical properties of porous media". 5.
- [15] Devore, J.; Famum, N.; Doi, J. 2013. "Applied Statistics for Engineers and Scientists". 3.
- [16] Troisi, S.; Fallico, C.; Straface, S.; Mazzuca, L. 2008. "Biodreni per la bonifica di siti contaminati realizzati con fibre naturali liberiane ad elevato sviluppo superficiale".

Effect of the substrate as electron donor during the microbial sulfate reduction and its possible applications in the biological treatment of acid mine drainage

Virginia Andrade¹ y Valeria Ochoa-Herrera^{1*}

¹Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias e Ingeniería El Politécnico, Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador.

*Autor principal/Corresponding author, e-mail: vochoa@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: Cesar Zambrano, Ph.D.

Recibido/Received: 16/05/2013. Aceptado/Accepted: 25/05/2013.

Publicado en línea/Published on Web: 28/06/2013. Impreso/Printed: 06/06/2013.

Abstract

The uncontrolled release of acid mine drainage (AMD) characterized by elevated concentrations of dissolved metals, high levels of sulfate ions and low pH values threatens the quality of water resources nearby mining areas worldwide. The development of novel technologies based on the precipitation of metals as metal sulfides catalyzed by sulfate reducing bacteria constitute an important method for the bioremediation of AMD. The objective of this study was to evaluate in batch experiments the efficiency of different organic substrates such as acetate, lactate, ethanol and peptone as electron donors during the generation of biogenic sulfide by different microbial inocula and its possible applications in the bioremediation of AMD. The highest sulfide production activity was obtained with 2.5 g acetate-COD L⁻¹ as substrate, 4000 mg SO₄²⁻ L⁻¹ as electron acceptor and the sediments of an artificial lagoon as bacterial inoculum. The final cumulative sulfide production was 463 mg S²⁻ L⁻¹, the maximum specific sulfide production activity was 9 mg S²⁻ g acetate⁻¹ d⁻¹, and the maximum specific sulfate reduction activity was 52 mg SO₄²⁻ g acetate⁻¹ d⁻¹. In terms of the substrate concentration, a 10-fold increase in the concentration of the electron donor resulted in substrate inhibition significantly decreasing the biogenic sulfide activities. The results of this study indicate that acetate was a highly effective substrate during the microbial sulfate reduction with a potential application in the remediation of acid mine drainage. Moreover, the use of acetate as electron donor favored the sulfate reducing activity through the inhibition of the methanogenic activity of the microorganisms present in the evaluated microbial inocula.

Keywords. sulfate reducing bacteria (SRB), acid mine drainage (AMD), organic substrates, electron donor, biogenic sulfide activity.

Resumen

La descarga no controlada de los drenajes ácidos de mina (DAM) caracterizados por presentar elevadas concentraciones de metales disueltos, iones sulfato y pH ácido amenaza la calidad de los cuerpos de agua cercanos a las zonas mineras alrededor del mundo. Tecnologías basadas en la precipitación de metales en forma de sulfuros metálicos, catalizada por las bacterias sulfato reductoras encargadas de la producción desasimilatoria de sulfuros constituyen un importante método de remediación de los DAM. En este trabajo de investigación se evaluó la eficiencia de diferentes sustratos tales como acetato, lactato, etanol y peptona como donadores de electrones durante la sulfato reducción microbiana. Diferentes inóculos microbianos y sus posibles aplicaciones en el tratamiento biológico de los DAM fueron estudiados en experimentos batch. La mayor eficiencia de producción de sulfuro catalizada por las bacterias sulfato reductoras fue alcanzada empleando 2.5 g DQO-acetato L⁻¹ como donador de electrones, 4000 mg SO₄²⁻ L⁻¹ como aceptor de electrones y los sedimentos de una laguna artificial como inóculo bacteriano. La producción final acumulada de sulfuro fue 463 mg S²⁻ L⁻¹, mientras que la actividad máxima específica de producción de sulfuro fue 9 mg S²⁻ g acetato⁻¹ d⁻¹ y la actividad máxima específica de reducción de sulfato fue 52 mg SO₄²⁻ g acetato⁻¹ d⁻¹. El efecto de la concentración de sustrato también fue evaluado, un incremento de 10X en la concentración del donador de electrones resultó en una inhibición por sustrato disminuyendo significativamente la actividad biogénica de generación de sulfuro. Los resultados de este estudio indican que acetato fue un sustrato muy eficiente durante la sulfato reducción microbiana con un gran potencial de aplicación en la remediación de los DAM. Más aún, el empleo de acetato como donador de electrones favoreció la actividad sulfato reductora a través de la inhibición de la actividad metanogénica de los microorganismos presentes en los inóculos microbianos evaluados.

Palabras Clave. bacterias sulfato reductoras, drenajes ácidos de mina (DAM), sustratos orgánicos, donadores de electrones, producción biogénica de sulfuro.

Introduction

The mining industry is one of the most important industries worldwide. However, the liquid discharges generated by this activity known as acid mine drainage (AMD) are considered, nowadays, one of the most serious environmental problems around the globe. AMD is characterized by high concentrations of heavy metals, sulfate ions and low pH values. AMD is generated through a combination of chemical and biological processes by which the metal sulfides from mining activities, such as pyrite (FeS_2), arsenopyrite (FeAsS), chalcopyrite (CuFeS_2), and sphalerite (ZnS) are oxidized and generate lixiviates which are very toxic to the ecosystem [1, 2].

The methods for the remediation of AMD based on the use of sulfate reducing bacteria (SRB) represent a promising technology for the biotreatment of mining effluents. SRB in the presence of sulfate and an organic substrate catalyzed the biogenic generation of sulfide that promotes the precipitation of heavy metals as metal sulfides, the increment of pH of the effluent due to the formation of bicarbonate during the oxidation of the organic substrate and the consumption of sulfate [1–3]. This type of treatment significantly reduces the negative impact of AMD in the ecosystems and human health.

Much research work has been focused on characterizing and evaluating the application of sulfate reducing processes to remediate contaminated AMD sites. The distribution and activity of SRB that utilizes acetate as substrate were studied by Karnachuk *et al.* using the sediments of the Norilsk mining area (Northern Siberia) [3]. Acetate was provided in concentrations of 0.5 g COD L^{-1} obtaining sulfate reduction rates averaged between 0.0048 and 2.88 mg $\text{SO}_4^{2-} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$. In addition, a SRB number of 2.5×10^6 cells mL^{-1} was determined by the most probable number (MPN) method [3]. In the study conducted by Manoues and coworkers with the sediments of Devils Lake in the northeast region of North Dakota, the importance of an adequate electron donor in the SRB activity was also illustrated. Bioassays conducted with 1.92 g acetate-COD L^{-1} with sulfate concentrations in the lake ranging between 300 and 3000 mg L^{-1} reported maximum specific sulfate reduction activities between 1.1 and 8.5 mg $\text{SO}_4^{2-} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ [4]. These results demonstrated the efficiency of acetate as substrate with sulfate reduction maximum specific activities six times higher than when acetate was not used [4].

The presence of SRB has also been investigated. Vladár *et al.* conducted a study in the sediments of Velencei Lake located in the southeast of Budapest (Hungary) to determine the presence of SRB [5]. In that study, lactate was provided as the electron donor and the most probable number method was utilized for determining the amount of SRB present in the sediments which was found to be 5.4×10^5 cells g sediment $^{-1}$. Among 47

SRB cultures were characterized through molecular methods. Different electron donors were also tested in order to obtain information of the substrate utilization capacity of the species isolated from the sediments [5].

The objective of this research work was to evaluate the capacity of SRB to utilize different substrates as electron donors during the microbial sulfate reduction and its possible applications in the biotreatment of acid mine drainage. Acetate, lactate, ethanol and peptone were evaluated in this study in the presence of sulfate in batch bioassays. The anaerobic microbial inocula tested included sludge and sediments from wastewater treatment plants, artificial and natural lagoons, and stabilization lagoons in Ecuador. Microbial competition between sulfate reducing bacteria and methanogens was also evaluated in the presence of acetate as electron donor.

Materials and Methods

Sludge and sediments

Anaerobic sludges from five sources were evaluated in the study. Three sludges came from wastewater treatment plants (WWTP) and two were lagoon sediments. An anaerobic sludge was obtained from the facultative lagoon of the WWTP of Ucubamba - ETAPA in Cuenca (S_1). Sludge from a WWTP in Quito was also used as microbial inoculum: hydrocyclone sludge (S_2) and sedimentation tank sludge or discharge sludge (S_3). The sediments of an artificial lagoon at the Universidad San Francisco de Quito - USFQ (S_4) and of a natural lagoon located in the Orellana Province (S_5) in the Amazonian region were also collected. The content of total suspended solids (TSS) and of volatile suspended solids (VSS) in the sludge and sediments was (TSS, VSS): S_1 (13.94%, 3.56%); S_2 (8.94 g L^{-1} , 5.92 g L^{-1}); S_3 (2.88 g L^{-1} , 2.00 g L^{-1}); S_4 (14.90%, 6.28%) and S_5 (20.64%, 2.69%), respectively. The sludge and sediments were stored in refrigeration at 4°C in plastic containers.

Culture media

The basal mineral medium used in the sulfate reduction and methanogenic bioassays contained (in mg L^{-1}): NH_4Cl (280); KH_2PO_4 (195); MgSO_4 (49); CaCl_2 (10); NaHCO_3 (3000); yeast extract (10); and 1 mL L^{-1} of trace element solution. The trace element solution contained (in mg L^{-1}): H_3BO_3 (50), $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2,000), ZnCl_2 (50), MnCl_2 (32), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (50), AlCl_3 (50), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2,000), $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (50), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (44), $\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (100), EDTA (1,000), resazurin (200), and 1 mL L^{-1} of HCl 36% [6]. The pH of the basal mineral medium was adjusted to 7.1–7.3 with HCl and NaOH, as required.

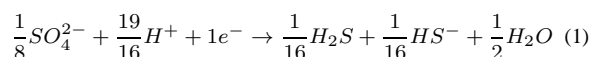
Chemicals

Sodium sulfate (100% purity) was obtained from J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Ammonium and iron

(III) sulfate, sodium acetate and ethanol (96%) were obtained from Laboratorios Químicos H.V.O. (Quito, Ecuador). Sulfuric acid (95 - 97 %) and peptone were obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). DMP (N,N-dimethyl-p-fenildiamine oxalate) (>99%) was obtained from Acros Organics (Geel, Belgium). Zinc chloride (97.1%) was obtained from J. T. Baker (Zedelgem, Belgium). Lactic acid (88 - 92%) was obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Alemania). N₂ gas was delivered from AGA Ecuador (Guayaquil, Ecuador). All the chemicals were used in the condition they were received.

Batch microbial bioassays

Batch microbial bioassays were conducted in duplicates using glass serum flasks (160 mL) with butyl rubbers stoppers and aluminum crimp seals. The headspace was flushed with N₂ gas to assure anaerobic conditions. Flasks lacking microorganisms were also incubated and served as abiotic controls. All bioassays were incubated in a home-made climate-controlled chamber at 30±2 °C. In the case of the sulfate reducing activity bioassays, each flask was supplemented with 100 ml basal mineral medium, 4000 mg SO₄²⁻ L⁻¹ as sodium sulfate, 10% v/v of microbial inoculum and the desired organic substrate concentration. The organic substrates evaluated were acetate (2.5 g COD L⁻¹), lactate (2.5 and 25 g COD L⁻¹), ethanol (2.5 and 25 g COD L⁻¹) and peptone (2.5 and 25 g L⁻¹). In the methanogenic activity bioassays, each flask was supplemented with 50 ml basal mineral medium, 2.14 g acetate-COD L⁻¹ and 10% v/v of microbial inoculum. The reduction of sulfate to sulfide was periodically monitored by measuring the S²⁻ concentration in aqueous phase and the methane generation was monitored during 5 days according to the protocol described in analytical methods. The maximum specific sulfide generation (mg S²⁻ g substrate⁻¹ d⁻¹) and methanogenic (mg CH₄-COD g VSS⁻¹ d⁻¹) activities were calculated from the slope of sulfide production and substrate concentration, and cumulative methane production and biomass concentration; respectively, versus time (d), as the mean value of duplicate assays. The maximum specific sulfate reduction activity was expressed in mg SO₄²⁻ g substrate⁻¹ d⁻¹. The sulfate concentration consumed was calculated based on the following microbial reduction reaction responsible of the generation of H₂S and HS⁻ proposed by Metcalf and Eddy [7].



Analytic methods

Total dissolved sulfide was analyzed colorimetrically by the methylene blue method at a wavelength of 670 nm [8, 9].

Methane generated during the anaerobic bioassays was determined by the liquid displacement method with serum flasks [10]. Total suspended solids (TSS) and volatile

suspended solids (VSS) were determined according to Standard Methods for Examination of Water and Wastewater [11].

Results and discussion

In this study, different organic substrates were evaluated in batch bioassays as electron donors during the biogenic generation of sulfide by a mix culture of SRB present in anaerobic sludge and sediments from different sources. Figure 1 represents an illustrative example of the time course of sulfide production with the use of acetate (2.5 g COD L⁻¹) as substrate in the presence of 4000 mg SO₄²⁻ L⁻¹ in an abiotic control (absence of microorganisms) and in the treatment bioassay with the sludge of the facultative lagoon of the WWTP in Cuenca as microbial inoculum. There was practically no sulfide production in the abiotic control, while in the treatment bioassay the production of S²⁻ gradually increased with incubation time. In fact, in the treatment, a maximum of 35.96 mg S²⁻ L⁻¹ were achieved after 45 days; whereas in the control, a sulfide concentration of 0.43 mg L⁻¹ was obtained in the same period of time. The same trend was observed in each of the microbial inocula and substrates evaluated in this study; the sulfide concentration increased in the treatment bioassays with incubation time and in the abiotic controls it remained constant and it was negligible. These results show that SRB present in the inocula evaluated used the substrates (acetate, lactate, ethanol, and peptone) as electron donors in a greater or lesser extent to support microbial sulfate reduction.

Hydrogen sulfide is a weak acid with dissociation constants Ka₁ and Ka₂ of 9.6 x 10⁻⁸ and 9.3 x 10⁻¹⁴, respectively [12]. Therefore at the working pH value of 7.1 - 7.3 evaluated in this study, the concentration ratio of the predominant species H₂S : HS⁻ was calculated to be 1 M : 0.96 M, practically [HS⁻] : [H₂S]. These results are consistent with the sulfate reduction proposed by Metcalf and Eddy (Eq. 1) [7] that shows an equimolar relationship between the generated H₂S and HS⁻ during the microbial sulfate reduction. Moreover, based on the Henry constant for H₂S at 25°C (1 x 10⁻¹ mol L⁻¹ atm⁻¹) [13], the concentration ratio of H₂S (ac) / H₂S (g) is 2.45; namely, for each mol of H₂S in the gaseous phase exists 2.45 mol of H₂S in aqueous phase, meaning that approximately 70% of the produced biogenic sulfide is in aqueous phase. In fact, in this study in the presence of 4000 mg SO₄²⁻ L⁻¹ and 2.5 g acetate-COD L⁻¹, the theoretical production of sulfide was calculated to be 666.7 mg S²⁻ L⁻¹. However, only 463.3 mg S²⁻ L⁻¹ were detected in aqueous phase in the bioassays conducted with the sediments of the artificial lagoon, so presumably the other 203.4 mg S²⁻ L⁻¹ were in gaseous phase, demonstrating that, in fact, approximately 70% of the total sulfide was present in aqueous solution.

Figure 2 illustrates the time course of the sulfide production in the presence of 2.5 g acetate-COD L⁻¹ and 4000

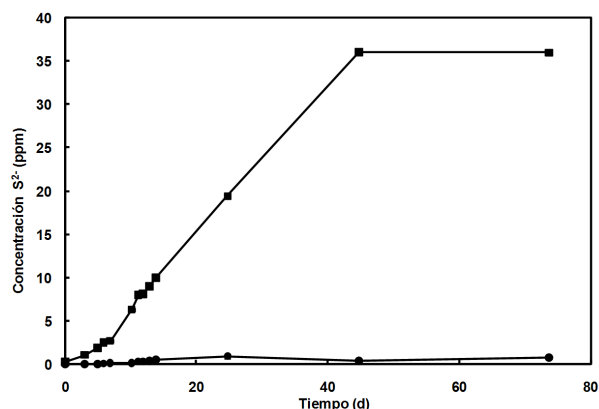


Figure 1: Time course of the sulfide production with 2.5 g acetate-COD L⁻¹ and 4000 mg SO₄²⁻ L⁻¹ with 10% v/v of the anaerobic sludge of the facultative lagoon of the WWTP in Cuenca (L₁). Legend: (●) abiotic control (acetate + sulfate); (■) treatment (acetate + sulfate + microorganism). Error bars represent the standard deviations of the bioassays performed in duplicates.

mg SO₄²⁻ L⁻¹ for the different anaerobic sludge and sediments evaluated in this study. Among the microbial inocula tested, the anaerobic sediments of the artificial lagoon showed the highest sulfide production, 463.25 mg S²⁻ L⁻¹ after 56 days of treatment. The final cumulative sulfide production, as well as the maximum specific sulfide production and sulfate reduction activities for the different anaerobic sludge and sediments evaluated in this study are presented in Table 1. The maximum specific sulfide production and sulfate reduction activities with the use of acetate as substrate varied between 0.25 and 8.74 mg S²⁻ g acetate⁻¹ d⁻¹, and 1.51 and 52.43 mg SO₄²⁻ g acetate⁻¹ d⁻¹, respectively. Based on these results, it can be concluded that the maximum specific sulfide generation or sulfate reduction activities of the sediments of the artificial lagoon is 18 times higher than the one of the sludge of the facultative lagoon in Cuenca, 15 and 35 times higher than the ones of the hydrocyclone sludge and discharge sludge of the WWTP in Quito, respectively.

These results are comparable with literature studies. Manoues *et al.* found maximum specific sulfate reduction activities up to 8.5 mg SO₄²⁻ L⁻¹ d⁻¹ with 1.92 g acetate-COD L⁻¹ and 3000 mg SO₄²⁻ L⁻¹ with the sediments of Devils Lake in North Dakota [4]. In the case of the sediments of the artificial lagoon, the best acetate oxidizer microbial inoculum between the ones evaluated in this study, the maximum specific sulfate reduction activity was 33 times higher than the one obtained by Manoues under similar conditions. These results indicate that acetate and the sediments of the artificial lagoon were highly efficient for the microbial sulfate reduction and are excellent candidates for the biotreatment of acid mine drainage in continuous systems.

Lactate was also evaluated in this study as electron donor during the microbial sulfate reduction. The highest maximum specific sulfate reduction activity was obtained with the sludge of the natural lagoon in the Orellana

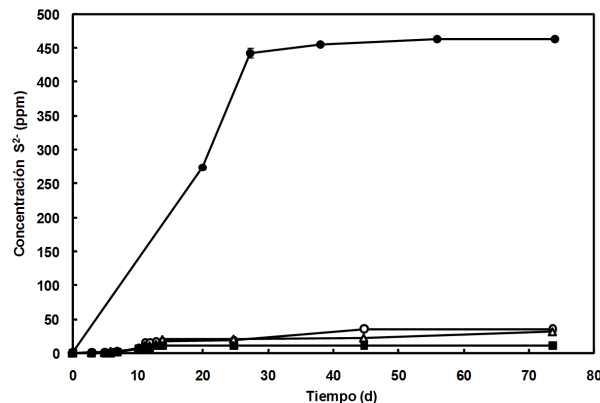


Figure 2: Time course of the sulfide production with 2.5 g acetate-COD L⁻¹ and 4000 mg SO₄²⁻ L⁻¹ with 10% v/v of microbial inocula from different sources in the bioassays treatments (acetate + sulfate + microorganism). Legend: (○) sediments of the facultative lagoon of the WWTP in Cuenca (L₁); (△) hydrocyclone sludge of a WWTP in Quito (L₂); (■) discharge sludge of a WWTP in Quito (L₃); (●) sediments of the artificial lagoon of the USFQ (L₄). Error bars represent the standard deviations of the bioassays performed in duplicates.

Province (Table 1). Practically all other inocula evaluated (with exception of the discharge sludge of the WWTP in Quito) present maximum specific sulfide production or sulfate reduction activities half the value obtained with the sediments of the natural lagoon which were 4.16 mg S²⁻ g substrate⁻¹ d⁻¹ and 24.97 mg SO₄²⁻ g substrate⁻¹ d⁻¹, respectively and those activities constitute only 50% of the maximum specific sulfide generation activity of the sediments of the artificial lagoon in the presence of acetate.

In recent studies, Oyekola and coworkers demonstrated the efficiency of lactate as substrate for the biological sulfate reduction [14]. Lactate concentration of 2.5 g lactate-COD L⁻¹ and sulfate concentrations between 1000 and 10,000 mg SO₄²⁻ L⁻¹ were provided. The maximum specific sulfate reduction activity obtained was of 864 mg SO₄²⁻ L⁻¹ d⁻¹ [14]. Studies conducted by Celis *et al.* also evaluated the use of lactate as substrate in the biogenic sulfate reduction [15]. Lactate and sulfate were provided in concentrations of 1 g COD L⁻¹ and 1500 mg L⁻¹, respectively and a maximum specific sulfate reduction activity of 830 mg SO₄²⁻ L⁻¹ d⁻¹ was obtained [15]. The sulfate reducing activity reported in the mentioned studies are one order of magnitude higher than the one obtained in this research work (65 mg SO₄²⁻ L⁻¹ d⁻¹ or 24.97 mg SO₄²⁻ g substrate⁻¹ d⁻¹) with the sediments of the natural lagoon. This difference suggests that the microbial consortium present in the sediments of the natural lagoon do not have a microbial lactate oxidizing activity as efficient as in the case of the mentioned studies.

Ethanol was also evaluated as substrate in the microbial sulfate reduction. The highest maximum specific sulfate reduction and sulfide generation activities achieved were 5.28 mg SO₄²⁻ g substrate⁻¹ d⁻¹ and 0.88 mg S²⁻ g substrate⁻¹ d⁻¹, respectively; and were obtained with the sediments of the artificial lagoon (Table 1). In

Substrate	Concentration g COD L ⁻¹	Anaerobic sludge and sediments	Final S ²⁻	Sulfide production	Sulfide reduction
			production	activity	activity
			mg S ²⁻ L ⁻¹	mg S ²⁻ g substrate ⁻¹ d ⁻¹	mg SO ₄ ²⁻ g substrate ⁻¹ d ⁻¹
Acetate	2.5	L1: Sediments of the facultative lagoon of a WWTP in Cuenca	35.96	0.48	2.88
		L2: Hydrocyclone sludge of a WWTP in Quito	31.99	0.60	3.58
		L3: Discharge sludge of a WWTP in Quito	11.64	0.25	1.51
		L4: Sediments of the artificial lagoon of the USFQ	463.25	8.74	52.43
Lactate	2.5	L1: Sediments of the facultative lagoon of a WWTP in Cuenca	125.33	1.73	10.39
		L2: Hydrocyclone sludge of a WWTP in Quito	171.50	2.42	14.51
		L3: Discharge sludge of a WWTP in Quito	22.15	0.14	0.81
		L4: Sediments of the artificial lagoon of the USFQ	74.40	1.63	9.78
		L5: Sediments of the natural lagoon in the Orellana Province	44.88	0.99	5.96
Lactate	25	L1: Sediments of the facultative lagoon of a WWTP in Cuenca	20.61	0.23	1.37
		L2: Hydrocyclone sludge of a WWTP in Quito	184.21	3.33	19.99
		L3: Discharge sludge of a WWTP in Quito	21.78	0.43	2.59
		L4: Sediments of the artificial lagoon of the USFQ	96.11	2.89	17.35
		L5: Sediments of the natural lagoon in the Orellana Province	44.88	0.99	5.96
Peptone	2.5	L1: Sediments of the facultative lagoon of a WWTP in Cuenca	77.04	1.45	8.71
		L2: Hydrocyclone sludge of a WWTP in Quito	15.66	0.24	1.42
		L3: Discharge sludge of a WWTP in Quito	4.93	0.21	1.27
		L4: Sediments of the artificial lagoon of the USFQ	27.13	0.34	2.06
Peptone	25	L1: Sediments of the facultative lagoon of a WWTP in Cuenca	6.43	0.013	0.08
		L2: Hydrocyclone sludge of a WWTP in Quito	15.72	0.023	0.14
		L3: Discharge sludge of a WWTP in Quito	19.19	0.036	0.22
		L4: Sediments of the artificial lagoon of the USFQ	12.54	0.024	0.15
Ethanol	2.5	L1: Sediments of the facultative lagoon of a WWTP in Cuenca	16.78	0.24	1.46
		L2: Hydrocyclone sludge of a WWTP in Quito	20.48	0.29	1.75
		L3: Discharge sludge of a WWTP in Quito	1.20	0.14	0.84
		L4: Sediments of the artificial lagoon of the USFQ	22.40	0.88	5.28
Ethanol	25	L1: Sediments of the facultative lagoon of a WWTP in Cuenca	49.94	0.048	0.288
		L2: Hydrocyclone sludge of a WWTP in Quito	1.70	0.003	0.020
		L3: Discharge sludge of a WWTP in Quito	0.36	0.001	0.004
		L4: Sediments of the artificial lagoon of the USFQ	1.34	0.007	0.042

Table 1: Final cumulative sulfide production and maximum specific sulfide production and sulfate reduction activities in the presence of 4000 mg SO₄²⁻ L⁻¹ with 2.5 and 25 g COD L⁻¹ of each substrate for the different anaerobic sludge and sediments evaluated in batch bioassays.

the case of the sediments of the facultative lagoon in Cuenca and of the hydrocyclone of the WWTP in Quito, the maximum specific sulfate reduction or sulfide generation activities are between 3 and 4 times lower than

the ones obtained with the sediments of the artificial lagoon. In contrast, the discharge sludge of the WWTP in Quito presents a maximum specific activity six times lower than the highest activity obtained. However, the

Sludge and sediments	mmol CH ₄ · L ⁻¹	mg CH ₄ -COD g VSS ⁻¹ d ⁻¹
L1: Sediments of the facultative lagoon of a WWTP in Cuenca	6.79	270.48
L2: Hydrocyclone sludge of a WWTP in Quito	4.99	208.23
L3: Discharge sludge of a WWTP in Quito	9.17	373.53
L4: Sediments of the artificial lagoon of the USFQ	2.19	48.85

Table 2: Methane production and maximum specific methane generation activities with 2.5 g acetate-COD L⁻¹ for the different anaerobic sludge and sediments.

maximum specific sulfide generation of the sediments of the artificial lagoon in the presence of ethanol is one order of magnitude lower than the one obtained with the same microbial inoculum with the use of acetate.

Previous studies conducted by Sierra-Álvarez *et al.* reported positive results in the removal of heavy metals with the use of ethanol as substrate in bioreactors packed with sulfate reducing bacteria [2]. In the study ethanol and sulfate were provided in concentrations of 0.9 g COD L⁻¹ and 700 mg L⁻¹, respectively. The maximum biogenic activity obtained was of 409 mg S²⁻ g VSS⁻¹ d⁻¹ together with heavy metal removal efficiencies exceeding 99.2% [2]. In this research work, using ethanol as substrate with the best inoculum evaluated (sediments of the artificial lagoon), the maximum biogenic activities achieved were of 0.18 mg S²⁻ g VSS⁻¹ d⁻¹ which are considerably lower than the one reported by Sierra-Álvarez *et al.* indicating that ethanol was not an efficient substrate for the SRB present in the sediments of the artificial lagoon.

In this study, the use of peptone was also evaluated as substrate during the microbial sulfate reduction. The highest maximum specific sulfide generation activity obtained was 1.45 mg S²⁻ g substrate⁻¹ d⁻¹ with the sediments of the facultative lagoon of the WWTP in Cuenca (Table 1). For all microbial inocula evaluated, the biogenic activities are similar averaging between 0.2 and 0.3 mg S²⁻ g substrate⁻¹ d⁻¹ and they are six times lower than the ones obtained with the sediments of the facultative lagoon. The highest maximum specific sulfide generation activity in the presence of peptone is 3 times lower than the one in which acetate is used as electron donor with the same inoculum, demonstrating, once again, the superior efficiency of acetate as substrate. Miyazato and coworkers illustrated the existence of SRB in an activated sludge cultured with peptone with a biogenic activities between 7.2 and 19.2 mg SO₄²⁻ g⁻¹ d⁻¹ which is comparable with the results obtained in this research work with the sediments of the facultative lagoon of the WWTP in Cuenca [16].

For all organic substrate evaluated in this study, lagoon sediments registered higher biogenic activities than the anaerobic sludge from the wastewater treatment plants. A possible explanation for this phenomenon is that during wastewater treatment the growth of methanogenic microorganisms is stimulated, debilitating sulfate reducing bacteria. In contrast, in lagoons, natural processes occur in which the sulfate reducing bacteria dominate because they are the strongest species.

The effect of the substrate concentration during the microbial sulfate reduction was also evaluated in this study. Lactate, peptone, and ethanol in concentrations 10 times higher than 2.5 g COD L⁻¹ were studied under the same experimental conditions described previously. Figure 3 represents an illustrative example of the time course of the sulfide generation in the presence of 25 g ethanol-COD L⁻¹. The results with 25 g COD L⁻¹ of lactate and peptone with different microbial inocula are similar to those reported in Figure 3 in terms of sulfide generation monitoring (no figures reported). The maximum specific sulfide generation and sulfate reduction activities are shown in Table 1. It is important to note that in general, the maximum specific sulfide generation and sulfate reduction activities together with the final cumulative sulfide production were greater when a lower substrate concentration (2.5 g COD L⁻¹) was provided in comparison with higher substrate concentrations (25 g COD L⁻¹). For instance, in the case of the hydrocyclone sludge of the WWTP in Quito, the sulfide production rate is two orders of magnitude higher with 2.5 g ethanol-COD L⁻¹ as compared with 25 g ethanol-COD L⁻¹. This fact can be attributed to a microbial inhibition when substrate is provided in excess as in the case of the bioassays conducted with 25 g substrate-COD L⁻¹.

Among all substrates evaluated in this study, acetate was found to be the best electron donor for the microbial

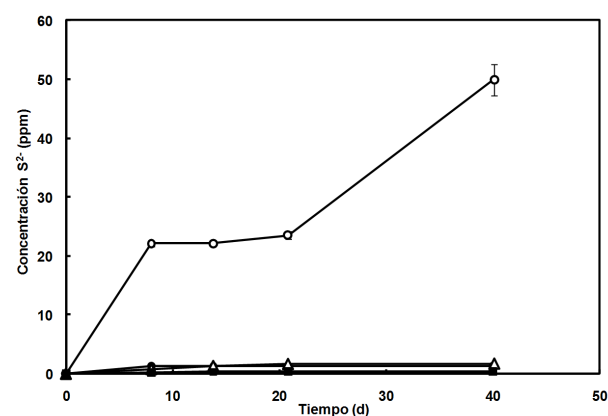


Figure 3: Time course of the sulfide production with 25 g ethanol-COD L⁻¹ and 4000 mg SO₄²⁻ L⁻¹ with 10% v/v of microbial inoculum from different sources in treatments bioassays (ethanol + sulfate + microorganisms). Legend: (o) sediments of the facultative lagoon of the WWTP in Cuenca (L₁); (Δ) hydrocyclone sludge from a WWTP in Quito (L₂); (■) discharge sludge from a WWTP in Quito (L₃); (●) sediments of the artificial lagoon of the USFQ (L₄). Error bars represent the standard deviations of the bioassays performed in duplicates

sulfate reduction with 4000 mg $\text{SO}_4^{2-} \text{L}^{-1}$. In the presence of 2.5 g acetate-COD L^{-1} , SRB present in the sediments of the artificial lagoon registered the highest cumulative sulfide production, maximum specific sulfide generation and sulfate reduction activities, 463.35 mg $\text{S}^{2-} \text{L}^{-1}$, 8.74 mg $\text{S}^{2-} \text{g acetate}^{-1} \text{d}^{-1}$ and 52.43 mg $\text{SO}_4^{2-} \text{g acetate}^{-1} \text{d}^{-1}$, respectively. Those activities are twice the value of the most representative maximum specific biogenic activity obtained with the use of the sediments of the natural lagoon in the Amazonian region with 2.5 g lactate-COD L^{-1} .

In the anaerobic microbial inocula evaluated in this study, different bacterial consortiums are expected to be present; even more, microbial competition for the organic substrate is very likely to take place. Therefore, the possible competence between methanogenic and sulfate reducing microorganisms was also studied in batch bioassays. Table 2 summarizes the methanogenic activities of microorganisms present in the sludge and sediments evaluated in this study. From the results obtained, it can be concluded that the methane generation follows an opposite trend to the sulfide production. The sediments of the artificial lagoon which presented the highest specific sulfide generation activity, registered the lowest maximum specific methane generation activity in the presence of 2.5 g acetate-COD L^{-1} . On the other hand, the discharge sludge of the WWTP in Quito shows the highest methanogenic activity and the lowest sulfidogenic activity under the same experimental conditions. Moreover, the maximum specific sulfide generation activity of the sediments of the artificial lagoon is 35 times higher than the one of the discharge sludge of the WWTP in Quito. In the case of the methane generation, the methanogenic activity of the discharge sludge is 8 times higher than the one of the sediments of the artificial lagoon. These results demonstrate that indeed a substrate competence exists between SRB and methanogens; however, in the presence of acetate and sulfate, the growth of SRB was stimulated while the activity of methanogenic microorganisms was inhibited.

These results are consistent with literature studies regarding microbial competition. For instance, Kristjansson and coworkers demonstrated a kinetic competence between methanogenic and sulfate reducing microorganisms with the latter ones showing a greater affinity for acetate when the substrate was not provided in excess [17]. These authors calculated the Monod constant (K_s) which were lower for SRB than for methanogenic microorganisms illustrating a greater affinity of the SRB towards acetate as substrate [17]. Moreover, Lowe *et al.* mentioned that in sedimentary ecosystems, the addition of acetate inhibits the methanogenesis [18]. In fact, a significant diminish in the methane production was obtained when acetate was provided, leading to the conclusion that carbon dioxide and hydrogen were the dominant precursors of methane in that environment [18].

Conclusions

Acetate was the most efficient electron donor for the microbial sulfate reduction with the sediments of the artificial lagoon as microbial inoculum. The use of lactate resulted in the second more efficient donor; however, the maximum specific sulfide production was only 50% of that obtained with acetate. The use of ethanol and peptone as substrates did not present a significant efficiency in the biogenic sulfide activities compared with the ones obtained with the use of acetate or lactate during the microbial sulfate reduction. Microbial competence between sulfate reducing bacteria and methanogens for the organic substrate was demonstrated, in fact in the presence of acetate a clear trend was observed, the highest the sulfate reduction, the lowest the methane production. Finally, the use of acetate with the sediments of the artificial lagoon present a great potential for the biotreatment of acid mine drainage characterized by elevated concentrations of heavy metals, sulfates and acidity.

References

- [1] Neculita; Zagury; Bussiere. 2007. "Passive treatment of acid mine drainage in bioreactors using sulfate-reducing bacteria: critical review and research needs". *Journal of Environmental Quality*, 36:1 – 13.
- [2] Sierra-Alvarez; Karri; Freeman. 2006. "Field, Biological Treatment of Heavy Metals in Acid Mine Drainage using Sulfate Reducing Bioreactors". *Water Science and Technology*, 54:179 – 185.
- [3] Karnachuk; Pimenov; Yusupov; Frank; Kaksonen; Puhakka; Ivanov; Lindstrom; Tuovinen; Tuovinen. 2005. "Sulfate Reduction Potential in Sediments in the Norilsk". *Geomicrobiology Journal*, 22:11 – 25.
- [4] Manoues; Gantzer; Stefan. 2007. "Spatial variation of sediment sulfate reduction rates in saline lake". *Journal of Environmental Engineering*, 12:1106 – 1116.
- [5] Vladár; Rusznyák; Márialigeti; Borsodi. 2007. "Diversity of Sulfate-Reducing Bacteria Inhabiting the Rhizosphere of *Phragmites australis* in Lake Velencei (Hungary) Revealed by a Combined Cultivation-based and Molecular approach". *Microbiology Ecology*, 56:64 – 75.
- [6] Ochoa-Herrera; Banihani; León; Khatri; Field; Sierra-Alvarez. 2009. "Toxicity of fluoride to microorganisms in biological wastewater treatment systems". *Water Research*, 43:3177 – 3186.
- [7] Metcalf; Eddy. 2003. "Wastewater Engineering Treatment and Reuse". *Fourth Edition*.
- [8] Trüper; Schlege. 1964. "Sulphur Metabolism in Thiorhodaceae I. Quantitative Measurements on Growing Cells of *Chromatium okenii*". *Antonie Leeuwenhoek*, 30:225 – 238.
- [9] Cline. 1969. "Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters". *Limnology and Oceanography*, 14:454 – 458.

- [10] Field. 1987. "Parameters Measurements". *Wageningen Agricultural University*.
- [11] APHA. 1998. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater". *20th ed. American Public Health Association: Washington DC*.
- [12] Skoog; West; Holler; Crouch. 2004. "Fundamentos de Química Analítica". *Madrid*.
- [13] Lide; Frederikse. 1995. "CRC Handbook of Chemistry and Physics". *6th Edition ed. Boca Raton, FL*.
- [14] Oluwaseun, O.; Oyekola, R.; Susan, T. 2009. "Study of Anaerobic Lactate Metabolism under Biosulfidogenic Conditions". *Water Research*, 43:3345 – 3354.
- [15] Celis, L.; Alpuche-Solís, A.; Ortega-Morales, O.; Razo-Flores, E. 2009. "Characterization of sulfate-reducing bacteria dominated surface communities during start-up of a down-flow fluidized bed reactor". *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36:111 – 121.
- [16] Miyazato, N.; Takamatsund, T. 2006. "Microbial community change of sulfate reduction and sulfur oxidation bacteria in the activated sludge cultivated with acetate and peptone". *Water Science & Technology*, 54:111 – 119.
- [17] Kristjansson; Schönheit. 1983. "Why do Sulfate-reducing Bacteria Outcompete Methanogenic Bacteria for Substrates?". *Oecologia*, 60:264 – 266.
- [18] Lowe; Jain-Mahendra; Zeikus. 1993. "Biology, Ecology, and Biotechnological Applications of Anaerobic Bacteria Adapted to Environmental Stresses in Temperature, pH, Salinity, or Substrates". *Microbiological Reviews*, 57:451 – 509.

Factor de emisión de CO₂ debido a la generación de electricidad en el Ecuador durante el periodo 2001 – 2011

René Parra^{1*}

¹Universidad San Francisco de Quito - Instituto de Investigaciones Atmosféricas - Colegio de Ciencias e Ingeniería
Diego de Robles S/N, Cumbayá.

*Autor principal/Corresponding author, e-mail: rrparr@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: Cesar Zambrano, Ph.D.

Recibido/Received: 23/04/2013. Aceptado/Accepted: 21/05/2013.

Publicado en línea/Published on Web: 28/06/2013. Impreso/Printed: 06/06/2013.

Abstract

Electricity is a key energetic component to socio-economic development. Its production is based on non-renewable resources (fossil fuels), renewable sources and nuclear energy. The generation by fossil fuels produces the emission of air pollutants and greenhouse gases, whose magnitude depends on the matrix or mix of power generation. The percentage of CO₂ emissions around the world attributed to electricity and heat generation reaches 41 %. The CO₂ emission factors per unit of electricity available for consumption in Ecuador were estimated for the period 2001-2011. The results vary between 214.0 and 397.5 g CO₂ kWh⁻¹. The highest value corresponds to 2010, the year with the highest participation of non-renewable resources (52.2 %). The lower value corresponds to 2003, year with lowest participation of non-renewable resources (34.5 %). The most recent value, for the year 2011, is 313.3 g CO₂ kWh⁻¹. This emission factor serves to establish indicators of sustainability (as the carbon or the ecological footprint) in different areas. It is a basic parameter in energy planning.

Keywords. ecological footprint, carbon footprint, mix of generation, sustainability, energy performance

Resumen

La electricidad constituye un elemento energético clave para el desarrollo socioeconómico. La producción de electricidad se basa en recursos no renovables (combustibles fósiles), fuentes renovables y energía nuclear. La generación mediante combustibles fósiles produce la emisión de contaminantes del aire y de gases de efecto invernadero, cuya magnitud depende de la matriz o mix de generación eléctrica. El porcentaje de las emisiones de CO₂ de todo el mundo que se atribuye a la electricidad y la generación de calor alcanza el 41 %. Se estimaron los factores de emisión de CO₂ por unidad de electricidad disponible para consumo en el Ecuador para el periodo 2001 – 2011. Los resultados varían entre 214.0 y 397.5 g CO₂ kWh⁻¹. El mayor valor corresponde al 2010, año con la mayor participación de fuentes no renovables (52.2 %). El menor valor corresponde al 2003, año con la menor participación de fuentes no renovables (34.5 %). El valor más reciente, para el año 2011, es 313.3 g CO₂ kWh⁻¹. Este factor de emisión sirve para establecer de indicadores de sustentabilidad (como la huella de carbono o la huella ecológica) en diferentes ámbitos. Es un parámetro básico en la planificación energética.

Palabras Clave. huella ecológica, huella de carbono, mix de generación, sustentabilidad, rendimiento energético.

Introducción

La electricidad constituye un elemento energético clave para el desarrollo socioeconómico en todos los ámbitos. Durante el año 2011 en el Ecuador se generaron 20 544.14 GWh de electricidad y se importaron 1294.59 GWh; totalizando 21 838.73 GWh. De este valor, el 86.6 % se destinó a consumo público; y el restante 13.4 % para

procesos productivos y de explotación [1].

La electricidad se genera en parte por la combustión de recursos no renovables, como los combustibles fósiles (carbón, diesel, bunker, gasolina, gas natural, gas licuado de petróleo, otros); que se utilizan típicamente en calderos, turbinas o motores de combustión interna. Estos dispositivos a su vez accionan un generador eléctrico. Los rendimientos energéticos (electricidad produci-

ISSN 1390-5384



Combustible	Unidad (en millones)	2001 [2]	2002 [3]	2003 [3]	2004 [3]	2005 [3]	2006 [3]	2007 [3]	2008 [3]	2009 [3]	2010 [3]	2011 [3]
Fuel oil	Galones	184.31	190.13	180.11	169.4	201.29	210.61	220.85	191.9	225.01	235.42	232.22
Diesel 2	Galones	88.46	78.65	55.1	91.78	120.14	171.49	166.47	124.31	207.8	315.2	172.52
Nafta	Galones	9.81	7.13	2.28	5.78	26.5	34.44	4	7.94	9.95	14.64	14.71
Gas natural	Pies cúbicos		5.11	8.92	11.32	12.3	15.72	16.46	14.38	19.3	20.04	17.71
Residuo	Galones							0.68		38.95	38.43	67.88
Crudo	Galones				3.68	5.06	5.51	35.33	37.53	57.04	60.53	62.81
Gas licuado de petróleo	Galones						7.59	7.55	0.93	7.58	7.75	7.07
Bagazo de caña	Toneladas					2.05	1.33	1.94	1.31	0.86	0.91	1.06

Tabla 1: Consumo de combustibles para la producción bruta de electricidad en el Ecuador, durante el periodo 2001-2011

Combustible	Poder calorífico			Factor de emisión de CO ₂			Densidad			Observaciones
	Valor	Unidad	Fuente	Valor	Unidad	Fuente	Valor	Unidad	Fuente	
Fuel oil	40.4	TJ Gg ⁻¹	[6]	77 400	kg TJ ⁻¹	[2]	944	kg m ⁻³	[7]	Se asume la densidad de la gasolina
Diesel 2	43	TJ Gg ⁻¹	[6]	74 100	kg TJ ⁻¹	[2]	845	kg m ⁻³	[7]	
Nafta	44.5	TJ Gg ⁻¹	[6]	73 300	kg TJ ⁻¹	[2]	739	kg m ⁻³	[7]	
Gas natural	48	TJ Gg ⁻¹	[6]	56 100	kg TJ ⁻¹	[2]	673	kg m ⁻³	[7]	
Residuo	40.4	TJ Gg ⁻¹	[6]	77 400	kg TJ ⁻¹	[2]	944	kg m ⁻³	[7]	
Crudo	42.3	TJ Gg ⁻¹	[6]	73 300	kg TJ ⁻¹	[2]	874	kg m ⁻³	[7]	70 % propano + 30 % butano
Gas licuado de petróleo	47.3	TJ Gg ⁻¹	[6]	63 100	kg TJ ⁻¹	[2]	528.6	kg m ⁻³	[7]	
Bagazo de caña	2220	kcal kg ⁻¹	[8]	780	kg Mg ⁻¹	[6]				

Tabla 2: Propiedades de los combustibles utilizados para la producción bruta de electricidad en el Ecuador, durante el periodo 2001-2011.

Combustible	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Fuel oil	2059.3	2124.3	2012.3	1892.7	2249.0	2353.1	2467.5	2144.1	2514.0	2630.3	2594.5
Diesel 2	901.5	801.5	561.5	935.3	1224.3	1747.6	1696.5	1266.8	2117.7	3212.1	1758.1
Nafta	89.5	65.1	20.8	52.7	241.8	314.2	36.5	72.4	90.8	133.6	134.2
Gas natural	0.0	262.4	458.1	581.4	631.7	807.3	845.3	738.5	991.2	1029.2	909.5
Residuo	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.6	0.0	435.2	429.4	758.4
Crudo	0.0	0.0	0.0	37.7	51.9	56.5	362.4	384.9	585.1	620.9	644.2
Gas licuado de petróleo	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	45.3	45.1	5.6	45.3	46.3	42.2
Bagazo de caña	0.0	0.0	0.0	0.0	1599.0	1037.4	1513.2	1021.8	670.8	709.8	826.8
Emissiones totales netas	3050.2	3253.3	3052.7	3499.8	4398.7	5324.1	5460.9	4612.3	6779.1	8101.7	6841.3

Tabla 3: Emisiones de CO₂ (kt año⁻¹) debido a la generación bruta de electricidad en el Ecuador durante el periodo 2001-2011.

da/calor liberado de combustión) con tecnologías convencionales son normalmente bajos, varían entre 0.3 y 0.35. Las tecnologías de cogeneración (generación de electricidad y aprovechamiento del calor de los gases de combustión) o de ciclo combinado (generación de electricidad y aprovechamiento del calor de los gases de combustión para generar una cantidad adicional de electricidad) permiten obtener rendimientos mayores, entre 0.4 y 0.55. El uso de combustibles fósiles para la generación de electricidad, implica la emisión de contaminantes del aire y de gases de efecto invernadero.

Las fuentes renovables (hidroeléctricas, biomasa, parques eólicos, parques fotovoltaicos, otras) y de energía nuclear, contribuyen en la generación de electricidad con un impacto mínimo o nulo en la generación de gases de efecto invernadero, aunque generan o presentan otros impactos o riesgos ambientales.

En el año 2008 se generaron 19.1 PWh de electricidad en todo el planeta, de los cuales el 67.2 % fue producido mediante combustibles líquidos, gas natural y carbón; el 19.3 % fue generado con fuentes renovables, y el 13.5 % en centrales nucleares. Para el año 2035 se proyecta que la participación de combustibles líquidos, gas natural y carbón sea del 60.2 % [4].

El porcentaje de las emisiones de dióxido de carbono (CO₂) que se atribuye a la electricidad es importante. Para el año 2010 se estima que la emisión de CO₂ de todo el mundo fue de 30.3 Gt; de las cuales, el 41 % corresponde a la generación eléctrica y de calor [5].

La matriz o mix de generación se refiere a la infraestructura de un país o región para la producción eléctrica. Define el nivel de emisiones de contaminantes del aire y de gases de efecto invernadero.

Una magnitud clave para el cálculo de indicadores de impacto o de sustentabilidad, es el factor de emisión de CO₂ por la generación de una unidad de electricidad.

Se presenta la estimación del factor de emisión de CO₂, debido a la generación de electricidad en el Ecuador, durante el periodo 2001 – 2011.

Métodos

Se recopiló información del Consejo Nacional de Electrificación (Conelec), en relación al consumo de combustibles para producción bruta de electricidad en el periodo 2001 – 2011 (Tabla 1). La producción bruta corresponde a la cantidad de electricidad generada mediante toda la infraestructura existente en el país, destinada tanto para servicio público y no público [2].

Para los combustibles de la Tabla 1, se recopiló información del poder calorífico, el factor de emisión de CO₂ debido a la combustión por unidad de combustible y la densidad (Tabla 2).

Adicionalmente se recopiló la información sobre la producción bruta de electricidad y de la cantidad de energía importada (Figura 1), y de la composición en porcentaje por tipo de fuente (Figura 2). Las fuentes se agrupan en

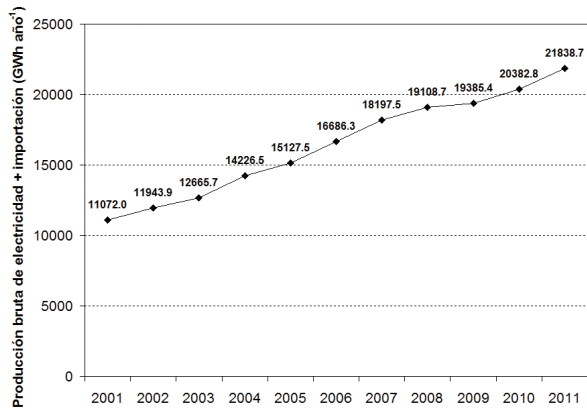


Figura 1: Producción bruta de electricidad en el Ecuador más energía importada (GWh año⁻¹) durante el periodo 2001–2011 [4, 5].

renovables (hidráulica principalmente; en menor grado, térmicas que usan bagazo de caña de azúcar; y eólica – fotovoltaica con participaciones marginales), no renovables (aprovechamiento energético de los combustibles fósiles en térmicas que funcionan con motores de combustión interna, turbinas de gas y turbinas de vapor) y las importaciones internacionales.

Resultados y Discusión

Con los datos de las Tablas 1 y 2, se calculan las emisiones de CO₂ debido a la generación bruta de electricidad (Tabla 3). Las emisiones totales netas no incluyen los valores de la caña de azúcar, considerando que al ser biomasa, su combustión no genera emisiones netas de CO₂.

El factor de emisión de CO₂ por cada unidad de electricidad disponible para consumo se establece dividiendo las emisiones totales netas de la Tabla 3, para los valores de producción bruta de electricidad más energía importada de la Figura 2. Los resultados se indican en la Figura 3.

Los resultados indican que las emisiones anuales de CO₂ debido a la generación bruta de electricidad en el Ecuador,

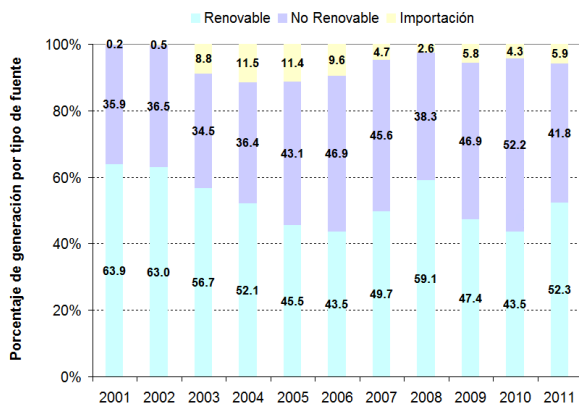


Figura 2: Composición en porcentaje de la generación de electricidad en el Ecuador durante el periodo 2001–2011 por tipo de fuente [2, 3, 9–17].

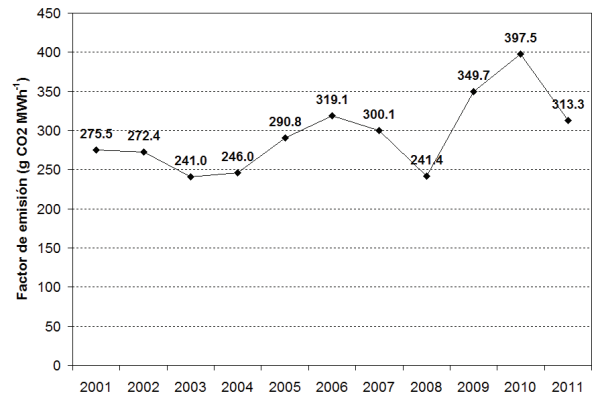


Figura 3: Factor de emisión de CO₂ (g kWh⁻¹) para la generación de electricidad en el Ecuador durante el periodo 2001–2011

en el periodo 2001–2011, variaron entre 241.0 y 397.5 g CO₂ kWh⁻¹.

El factor de emisión de CO₂ por cada unidad de electricidad disponible para consumo, varió entre 241.0 y 397.5 g CO₂ kWh⁻¹. El mayor valor del factor de emisión corresponde al año 2010, año con el mayor porcentaje de participación de fuentes no renovables (52.2 %). El menor valor corresponde al 2003, año con la menor participación de fuentes no renovables (34.5 %).

La Agencia Internacional de la Energía [3] reporta el valor medio del factor de emisión para el Ecuador, para el periodo 2008 – 2010, igual a 319.3 g CO₂ kWh⁻¹. El valor medio del periodo 2008 – 2010, de la Figura 3 es igual a 329.5 g CO₂ kWh⁻¹, con una diferencia del 3.2 %.

Algunos países con el promedio 2008 – 2010 del factor de emisión mayores al Ecuador son: Estonia (1059), India (936), China (790), Grecia (730), Estados Unidos (528), México (447), Chile (398), Argentina (365) [3].

Algunos países con el promedio 2008 – 2010 del factor de emisión menores al Ecuador son: Canadá (183), Colombia (153), Brasil (81), Suecia (22), Noruega (10) [3].

El valor más reciente que se puede deducir en base a la información pública del CONLEC corresponde al 2011, que presenta un factor de emisión de 313.3 g CO₂ kWh⁻¹. En este año los porcentajes de participación fueron del 52.3 %, 41.8 % y 5.9 % para las fuentes renovables, no renovables e importación, respectivamente.

Conclusiones

El factor de emisión de CO₂ por el consumo unitario de electricidad es utilizado en varios ámbitos: nacional, regional, local, institucional, familiar, personal; en evaluaciones de indicadores de sustentabilidad, como la huella de carbono, la huella ecológica. Es un parámetro básico en la planificación energética para evaluar el cambio de las emisiones con nuevas configuraciones de la matriz o mix energético.

Para reducir las emisiones por la generación de electricidad, se deben trabajar de manera prioritaria en ahorro y eficiencia energética; así como en la reducción del factor de emisión. Para el segundo punto, se pueden analizar la viabilidad del cambio a tecnológicas más eficientes, como las centrales de ciclo combinado; y el incremento de la generación de fuentes renovables, eligiendo opciones con el mínimo impacto y riesgo ambiental.

Agradecimientos

A María del Carmen Cazorla, por sus observaciones y sugerencias; así como por la revisión del texto en inglés.

Referencias

- [1] Conelec. 2012. "2011 Estadísticas del sector eléctrico ecuatoriano. Folleto Resumen". *Quito, Ecuador*, 46.
- [2] Conelec. "Estadísticas del Sector Eléctrico Ecuatoriano. Año 2001" Versión Preliminar. *Quito – Ecuador*.
- [3] Conelec. 2012. "2011 Estadísticas del Sector Eléctrico Ecuatoriano". Folleto Multianual. *Quito – Ecuador*.
- [4] EIA. 2011. "International Energy Outlook 2011". *U.S. Energy Information Administration. Washington – USA*, 292.
- [5] IEA. 2013. "IEA Statistics. 2012 Edition. CO₂ Emissions From Fuel Combustión. Highlights". *International Energy Agency. Paris – France*, 125.
- [6] IPCC. 2006. "2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories, Prepared by the National Greenhouse Gas Inventories Programme". *Eggleston H.S., Buendia L., Miwa K., Ngara T. and Tanabe K. (eds). Published: IGES, Japan*.
- [7] USEPA. 1985. "Miscellaneous Data & Conversion Factors". *Apendix A*.
- [8] USEPA. 1996. "Bagasse combustion in sugar mills". *US Environmental Protection Agency. AP 42, Fifth Edition, Volume I. Chapter 1: External Combustion Sources*.
- [9] Conelec. 2003. "Estadística del Sector Eléctrico Ecuatoriano. Año 2002". *Primera Revisión. Quito – Ecuador*, 350.
- [10] Conelec. "Estadística del Sector Eléctrico Ecuatoriano. Año 2003". *Quito – Ecuador*, 394.
- [11] Conelec. "Estadística del Sector Eléctrico Ecuatoriano. Año 2004". *Quito – Ecuador*, 425.
- [12] Conelec. "Estadísticas del Sector Eléctrico Ecuatoriano. Año 2005".
- [13] Conelec. 2007. "Estadística del Sector Eléctrico Ecuatoriano. Año 2006". *Quito – Ecuador*, 310.
- [14] Conelec. 2008. "Estadística del Sector Eléctrico Ecuatoriano. Año 2007". *Quito – Ecuador*, 367.
- [15] Conelec. 2009. "Estadística del Sector Eléctrico Ecuatoriano. Año 2008". *Quito – Ecuador*, 362.
- [16] Conelec. 2010. "Estadística del Sector Eléctrico Ecuatoriano. Año 2009". *Quito – Ecuador*, 388.
- [17] Conelec. 2011. "2010. Boletín Estadístico del Sector Eléctrico Ecuatoriano". *Quito – Ecuador*, 204.